



## **Ciclo reprodutivo e patologias da ostra portuguesa, *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) no estuário do Sado**

**Ana Catarina Bento Adrião da Fonseca Grade**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em:  
**Gestão e Conservação de Recursos Naturais**

Orientadores: Doutora Maria Manuel Pimenta Angélico  
Professora Doutora Helena Adão

### **Júri:**

Presidente: Doutora Maria Teresa Marques Ferreira, Professora catedrática do Instituto Superior de Agronomia da universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso, Professor auxiliar do(a) Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa;

Doutora Maria Manuel Pimenta Angélico, Investigadora auxiliar do(a) Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P.

## **I. Agradecimentos**

Quero agradecer às minhas orientadoras. À Manel pelo apoio demonstrado, disponibilidade, incentivo e dicas no planeamento do trabalho e durante a escrita da tese. À professora Helena pela sua disponibilidade e ajuda sempre que precisei.

Ao Dr. Ruano, que apesar de não ser orientador oficial, foi uma ajuda crucial no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por estar sempre disponível a esclarecer dúvidas. Obrigada pelos ensinamentos sobre patologia de bivalves.

Ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), I.P., pela cedência das condições necessárias e colaboração para a realização deste trabalho. A todos os colegas que foram apoiando.

Ao Lino pela disponibilidade e ajuda, principalmente na análise de dados.

A todo o pessoal que envolveu o projecto Crassosado. Ao Lobo-do-mar, Carlos pelo apoio na navegação no Sado e pelas histórias hilariantes e à Dra. Cristina Falcão pela disponibilidade prestada. À D. Cecília e ao Sr. Américo do viveiro Anjos, pela cedência de mesas para realização das experiências com as ostras.

À Filipa e à Teresinha que me ajudaram nas amostragens e que contribuíram com muitos bons momentos. À Filipa, principalmente, obrigada pela amizade e por todo o apoio até hoje (I love pilrita!).

Agradeço à Graça e Leonor pela ajuda na parte prática e ao Daniel, que se juntou ao laboratório mais recentemente, pela ajuda em dúvidas na parte escrita.

Agradeço às minhas companheiras Rita e Soraia por esta jornada.

Agradeço a todos os meus amigos, por me irem acompanhando e perguntando pelo trabalho, seus chatos! Agradeço, especialmente à Carla pela nossa amizade-irmandade e por estar sempre ao meu lado.

A toda a minha família pelo apoio. Aos meus pais pela incansável dedicação e ajuda. Sem eles não seria mesmo possível.

Ao João Paulo por tudo o que representa para mim, pela ajuda, por toda a força e paciência. Obrigada por estares sempre comigo!

Por fim, à pequena Alice, a personagem principal da minha vida...

## II. Resumo

A ostra portuguesa, *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819), é um recurso de grande relevância económica e ecológica. No estuário do Sado foi uma espécie relevante na produção aquícola até à década de 1970, altura em que praticamente desapareceu devido a mortalidades massivas. Atualmente parece estar em recuperação, sendo necessário o desenvolvimento de estudos, que o comprovem e que promovam o seu restabelecimento.

Este estudo tem por finalidade analisar o ciclo reprodutivo da espécie no estuário do Sado e o seu estado sanitário, comparando ostras de um banco natural com ostras transplantadas para um viveiro.

A análise do ciclo reprodutivo, mostrou que a gametogénese teve início no final do Inverno e início da Primavera, ocorrendo o pico da desova no Verão. A maior percentagem de ocupação da gónada em relação aos restantes tecidos foi determinada quando as ostras estavam nos estados III (gónada madura) e IV (desova). Foi possível determinar que nos meses mais frios não foram observadas ostras maduras nem em desova e que a mesma se iniciou com temperaturas acima dos 18°C.

Na avaliação do estado sanitário observou-se uma baixa patogenicidade dos agentes patogénicos detetados e não se registaram episódios de mortalidade. Registaram-se 96,6% e 89,6% de indivíduos com pelo menos uma lesão, alteração morfológica ou a presença de parasitas no banco natural e viveiro, respectivamente. Segundo o índice de avaliação do estado sanitário elaborado neste estudo- IAESO, não foram encontradas ostras em estado crítico no viveiro, contrastando com 4,2% de ostras do banco nesse estado. Constatou-se uma melhoria da condição das ostras ao serem transplantadas para o viveiro.

Este estudo constitui um contributo para o conhecimento da biologia e o estado das populações de ostra portuguesa no estuário do Sado permitindo a conservação e a exploração sustentada deste recurso, face às pressões do meio envolvente.

**Palavras-passe:** *Crassostrea angulata*, Ostra portuguesa, Estuário do Sado, Ciclo reprodutivo, Estado sanitário.

### III. Abstract

The Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819), is a resource of great economic and ecological relevance. At Sado estuary until the 1970s, it was a relevant species for aquaculture production, since then it disappeared due to massive mortalities. Currently, this resource is recovering and the baseline knowledge is essential to promote its restoration and population recovery.

The main aim of this study was to analyze the reproductive cycle of the species in Sado estuary and its health status, comparing oysters from a natural bed with oysters transplanted to a nursery.

The analysis of the reproductive cycle showed that gametogenesis began in late winter and early spring, presenting a peak of spawning in summer. The largest area occupied by the gonad relative to the other tissues was identified at states III (mature gonads) and IV (spawning). It was possible to determine that in the colder months no mature or spawning oysters were observed and that it started at temperatures above 18 ° C.

In the assessment of health status, low pathogenicity of the detected pathogens was observed and episodes of mortality were not recorded. There were 96.6% and 89.6% of individuals with at least one lesion, morphological alteration or with presence of parasites in the natural bed and nursery, respectively. According to the health status assessment index developed in this study- IAESO, no oysters in the “critical state” were found in the nursery, in contrast to 4.2% of the natural bed oysters in this state. There was an improvement in the condition of oysters when transplanted to the nursery.

This study reinforces knowledge about the biology and status of Portuguese oyster populations in the Sado estuary supporting the management and conservation of the sustainable exploitation.

**Keywords:** *Crassostrea angulata*, Portuguese oyster, Sado estuary, Reproductive cycle, Health status.

## IV. Índice

I. Agradecimentos .....	ii
II. Resumo.....	iii
III. Abstract.....	iv
IV. Índice .....	v
V. Lista de figuras.....	vii
VI. Lista de quadros.....	xi
VII. Lista de abreviaturas .....	xii
1. Introdução .....	2
1.1. Enquadramento.....	2
1.2. Local de estudo.....	7
1.2.1. A ostra portuguesa no Estuário do Sado .....	9
1.3. Objetivos .....	10
2. Ciclo reprodutivo .....	13
2.1. Enquadramento.....	13
2.2. Metodologia .....	16
2.2.1. Amostragem.....	17
2.2.2. Trabalho laboratorial .....	17
2.2.3. Parâmetros ambientais: temperatura e salinidade.....	19
2.2.4. Análise de dados.....	19
2.3. Resultados .....	20
2.3.1. Proporção entre sexos e estados de desenvolvimento.....	20
2.3.2. Área de ocupação da gónada .....	24
2.3.3. Parâmetros ambientais: temperatura e salinidade.....	25
2.4. Discussão .....	28
2.4.1. Proporção entre sexos e estados de desenvolvimento.....	28
2.4.2. Área de ocupação da gónada .....	30
2.4.3. Ciclo reprodutivo e Parâmetros ambientais (temperatura e salinidade) .....	32
3. Patologias - Estado sanitário .....	38
3.1. Enquadramento.....	38
3.2. Metodologia .....	44
3.2.1. Amostragem.....	44
3.2.2. Trabalho laboratorial .....	45
3.2.2.1. Observações macroscópicas .....	45
3.2.2.2. Histopatologia.....	46

3.2.3. Análise dos dados.....	49
3.3. Resultados .....	50
3.3.1. Observações macroscópicas .....	51
3.3.2. Histopatologia .....	55
3.4. Discussão .....	62
3.4.1. Observações macroscópicas .....	62
3.2.1. Histopatologia .....	66
4. Considerações finais .....	74
5. Referências bibliográficas .....	77
6. Anexos .....	89
Anexo I. Distribuição temporal de temperatura, salinidade e pressão registadas em contínuo através de sensores fundeados no canal de Alcácer do Sal, junto ao banco Batalha, no período de Março de 2015 a Março de 2016 (taxa de amostragem de 10 min). Dados retirados do projecto crassosado,2016.....	89
Anexo II. Resumo dos resultados dos testes pareados complementares ao teste PERMANOVA. ....	93
Anexo III. Resultados da análise SIMPER.....	94
Anexo IV. Resumo dos resultados da regressão linear múltipla, com o estado de carnes e o estado de desenvolvimento da gónada de cada ostra amostrada como variáveis independentes e o valor do índice como variável dependente .....	95

## V. Lista de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Produção de ostras do género <i>Crassostrea sp.</i> de 2007 a 2017, em Portugal (DGRM, 2019).....	4
<b>Figura 1.2.</b> Mapa representativo da Reserva Natural do Estuário do Sado (RNES) (ICNF, 2018) .....	7
<b>Figura 2.1.</b> Esquema representativo do ciclo reprodutivo de <i>Crassostrea angulata</i> .....	14
<b>Figura 2.2.</b> Altura média das ostras (em cm) recolhidas entre Março de 2015 e Março de 2016, no banco Batalha para o estudo do ciclo reprodutivo.....	20
<b>Figura 2.3.</b> Variação mensal do sexo das ostras recolhidas entre Março de 2015 e Março de 2016, no banco Batalha para o estudo do ciclo reprodutivo.....	21
<b>Figura 2.4.</b> Gónadas de fêmea (A,C,E,G,I) e de macho (B,D,F,H,J) em diferentes estados de desenvolvimento de <i>Crassostrea angulata</i> do banco natural Batalha, do estuário do Sado. Estado I (A, B), estado II (C,D), estado III (E,F), estado IV (G,H), estado V (I,J).....	23
<b>Figura 2.5.</b> Estados de maturação das ostras recolhidas entre Março de 2015 e Março de 2016, no banco Batalha para o estudo do ciclo reprodutivo.....	24
<b>Figura 2.6.</b> Percentagem média de área ocupada pela gónada em cada estado de desenvolvimento no total dos indivíduos (a) e percentagem média de área ocupada pela gónada em cada estado de desenvolvimento com a diferenciação por por sexo (b), das ostras recolhidas entre Março de 2015 e Março de 2016, no banco natural. M- machos; F- fêmeas.....	25

**Figura 2.7.** Evolução da temperatura da água do estuário do Sado (curva a vermelho), registada com o sensor (CTD Star Oddi) fundeado no pilar da ponte ferroviária sobre o Canal de Alcácer, junto ao banco Batalha, e da temperatura do ar (curva a verde) registada na estação meteorológica do IPMA de Alcácer do Sal. As temperaturas do ar registadas são as médias dos últimos 10 minutos de cada hora.....26

**Figura 2.8.** Evolução da salinidade registada com o sensor (CTD Star Oddi) fundeado no pilar da ponte ferroviária sobre o Canal de Alcácer, junto ao banco Batalha. No período compreendido entre o início de junho e o início de agosto de 2015 os dados são de baixa confiança, por o sensor ter apresentado anomalias.....27

**Figura 2.9.** Variação da percentagem de área ocupada pela gónada e da temperatura ao longo dos meses de estudo. Os valores da temperatura correspondem aos valores médios dos 15 dias antecedentes ao dia de recolha das ostras no banco natural Batalha para estudo do ciclo reprodutivo. Não existem dados da temperatura da água de Março de 2015, visto ter sido o mês de início da experiência.....27

**Figura 3.1.** Localização dos dois locais de amostragem no estuário do Sado, B- banco natural Batalha e V- Viveiro “Anjos”.....45

**Figura 3.2.** Altura média das ostras recolhidas ao longo dos meses de amostragem no banco (A) e no viveiro (B) (MAR’15- Março de 2015; JUN- Junho; SET- Setembro; DEZ- Dezembro; MAR’16- Março de 2016).....50

**Figura 3.3.** Coloração global em indivíduos do banco Batalha (A) e do viveiro (B).....51

**Figura 3.4.** Coloração dos indivíduos de ostra portuguesa recolhidos no banco natural (B) e viveiro (V) em diferentes meses de amostragem.....52

**Figura 3.5.** Lesões e parasitas analisados macroscopicamente nos indivíduos recolhidos no banco natural.....52



**Figura 3.6.** Lesões e parasitas analisados macroscopicamente nos indivíduos recolhidos no dos no viveiro.....53

**Figura 3.7.** Prevalência de ampolagem em indivíduos de ostra portuguesa recolhidos no banco natural e no viveiro entre Março de 2015 e 2016.....53

**Figura 3.8.** Lesões ou alterações morfológicas e agentes patogénicos detectados ao microscópio ótico em ostras recolhidas no banco natural. As lesões e agentes patogénicos observados são: Copépodes (Cop.); Ciliados da glândula digestiva (Ci.Gd); Ciliados nas brânquias e manto (Ci.BrMt); Esporozoários (Esp.); Rickétsias (Ric.); Edema no manto (E.Mt); Edema no tecido conjuntivo (E.Tc); Necrose na glândula digestiva (N.Gd); Necrose no manto (N.Mt); Necrose no tecido conjuntivo (N.Tc); Necrose nas brânquias (N.Br); Metalasia na glândula digestiva (Met.Gd); Hemocitose na glândula digestiva (H.Gd); Hemocitose no manto (H.Mt); Hemocitose no tecido conjuntivo (H.Tc); Hemocitose nas brânquias (H.Br); Ceroidose (Cero.).....56

**Figura 3.9.** Lesões ou alterações morfológicas e agentes patogénicos detectados ao microscópio ótico em ostras recolhidas no viveiro. As lesões e agentes patogénicos observados são: Copépodes (Cop.); Ciliados da glândula digestiva (Ci.Gd); Ciliados nas brânquias e manto (Ci.BrMt); Esporozoários (Esp.); Rickétsia (Ric.); Edema no manto (E.Mt); Edema no tecido conjuntivo (E.Tc); Necrose na glândula digestiva (N.Gd); Necrose no manto (N.Mt); Necrose no tecido conjuntivo (N.Tc); Necrose nas brânquias (N.Br); Metalasia na glândula digestiva (Met.Gd); Hemocitose na glândula digestiva (H.Gd); Hemocitose no manto (H.Mt); Hemocitose no tecido conjuntivo (H.Tc); Hemocitose nas brânquias (H.Br); Ceroidose (Cero.).....56

**Figura 3.10.** Exemplo de parasitas e lesões detectados neste trabalho em espécimes de *Crassostrea angulata* recolhidos no estuário do sado. A, Ciliados *Tricodina* sp., em tecido branquial, um pouco necrótico; B, Ciliados *Tricodina* sp, no manto; C, Ciliados *Ancistrocoma* sp. na glândula digestiva e colónias de Rickétsias nas paredes dos túbulos da glândula digestiva (setas); D, Copépode *Mytillicola* sp. no intestino; E, Esporozoário na glândula digestiva; F, Metaplasia dos ductos e túbulos da glândula digestiva com alguma necrose do tecido.....57

**Figura 3.11.** Lesões ou alterações morfológicas e agentes patogénicos detectados ao microscópio em ostras recolhidas no banco Batalha, em cada mês de amostragem. As lesões e agentes patogénicos observados são: Ceroidose (Cero.); Hemocitose nas brânquias (H.Br); Hemocitose no tecido conjuntivo (H.Tc); Hemocitose no manto (H.Mt); Hemocitose na glândula digestiva (H.Gd); Metaplasia na glândula digestiva (Met.Gd); Necrose nas brânquias (N.Br); Necrose no tecido conjuntivo (N.Tc); Necrose no manto (N.Mt); Necrose na glândula digestiva (N.Gd); Edema no tecido conjuntivo (E.Tc); Edema no manto (E.Mt); Rickettsia (Ric.); Esporozoários (Esp.); Ciliados nas brânquias e manto (Ci.BrMt); Ciliados da glândula digestiva (Ci.Gd); Copépode (Cop.).....59

**Figura 3.12.** Lesões ou alterações morfológicas e agentes patogénicos detectados ao microscópio em ostras recolhidas no banco viveiro “Anjos”, em cada mês de amostragem. As lesões e agentes patogénicos observados são: Ceroidose (Cero.); Hemocitose nas brânquias (H.Br); Hemocitose no tecido conjuntivo (H.Tc); Hemocitose no manto (H.Mt); Hemocitose na glândula digestiva (H.Gd); Metaplasia na glândula digestiva (Met.Gd); Necrose nas brânquias (N.Br); Necrose no tecido conjuntivo (N.Tc); Necrose no manto (N.Mt); Necrose na glândula digestiva (N.Gd); Edema no tecido conjuntivo (E.Tc); Edema no manto (E.Mt); Rickettsia (Ric.); Esporozoários (Esp.); Ciliados nas brânquias e manto (Ci.BrMt); Ciliados da glândula digestiva (Ci.Gd); Copépode (Cop.).....60

**Figura 3.13.** Histogramas representativos da distribuição dos indivíduos de *C. angulata* após o cálculo do índice de estado sanitário no banco natural (A) e no viveiro (B).....62

## VI. Lista de quadros

<b>Tabela 2.1.</b> Escala de classificação de estados de desenvolvimento de gónadas de ostras do género <i>Crassostrea sp.</i> (adaptada de Mann,1979 e Steele e Mulcahy,1999); (M-machos; F- fêmeas).....	18
<b>Tabela 2.2.</b> Tabela resumo dos estados de maturação e ratio sexual das ostras recolhidas entre Março de 2015 e Março de 2016, no banco Batalha para o estudo do ciclo reprodutivo (F-Fêmeas; M- Machos; I- Indiferenciados).....	21
<b>Tabela 3.1.</b> Escala de avaliação de intensidade de agentes patogénicos e lesões e/ou alterações morfológicas em cortes histológicos de <i>C. angulata</i> . Nota: o resultado tem em conta a avaliação de todo o corte histológico de cada espécime.....	47
<b>Tabela 3.2.</b> Escala de avaliação de gravidade de agentes patogénicos e lesões/alterações morfológicas em cortes histológicos de <i>C. angulata</i> , 1=razoável; 2= grave; 3= muito grave.....	47
<b>Tabela 3.3.</b> Classificação do estado das ostras segundo o índice de avaliação do estado sanitário das ostras (IAESO).....	48
<b>Tabela 3.4.</b> Exemplo de aplicação escala da avaliação de intensidade de agentes patogénicos e lesões e/ou alterações morfológicas em cortes histológicos a um espécime de <i>C. angulata</i> . Ceroidose (Cero.); Hemocitose nas brânquias (H.Br); Hemocitose no tecido conjuntivo (H.Tc); Hemocitose no manto (H.Mt); Hemocitose na glândula digestiva (H.Gd); Metalasia na glândula digestiva (Met.); Necrose nas brânquias (N.Br); Necrose no tecido conjuntivo (N.Tc); Necrose no manto (N.Mt); Necrose na glândula digestiva (N.Gd); Edema no tecido conjuntivo (E.Tc); Edema no manto (E.Mt); Rickétsias (Ric.); Esporozoários (Esp.); Ciliados nas brânquias e manto (Ci.BrMt); Ciliados da glândula digestiva (Ci.Gd); Copépodes (Cop.).....	49
<b>Tabela 3.5.</b> Tabela resumo dos resultados do teste PERMANOVA.....	60

## VII. Lista de abreviaturas

t - Toneladas

DGRM - Direção- Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos

‰ - Permilagem

°C - Grau Celsius

km - Quilómetros

m - Metros

km<sup>2</sup> – Quilómetros quadrados

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

cm - Centímetros

% - Percentagem

µm – Micrómetro

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera

e.g.- do latim *exempli gratia*, por exemplo

n – Número de indivíduos

mg/m<sup>3</sup> – Miligramas por metro cúbico

IAESO – Índice de Avaliação do Estado Sanitário das Ostras

# **CAPÍTULO 1.**

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1. Introdução

### 1.1. Enquadramento

A ostra portuguesa, inicialmente designada de *Gryphae angulata* por Lamarck (1819), é um molusco bivalve pertencente à família Ostreidae sendo, segundo o “World Register of Marine Species” (WoRMS, 2019), classificada actualmente, da seguinte forma:

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Classe: Bivalvia

Subclasse: Pteriomorphia

Ordem: Ostreida

Superfamília: Ostreoidea

Família: Ostreidae

Subfamília: Crassostreinae

Género: *Crassostrea*

Espécie: *Crassostrea angulata*.

Segundo Vilela (1975), os moluscos desta família caracterizam-se por, possuírem uma concha “inequivalente mais ou menos inequilátera”, com um ligamento interno e charneira sem dentes, terem um músculo adutor na concha e por não terem um órgão que lhes permita a locomoção. A esta família pertencem, para além das já extintas, as ostras dos géneros *Ostrea*, *Crassostrea* e *Pycnodonte* (Galtsoff, 1964). Dentro dos géneros *Ostrea* e *Crassostrea*, pode atribuir-se uma relevância económica a algumas espécies neles incluídas, e.g. *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica* e *Crassostrea angulata* (Vilela, 1975). Das diferenças mais marcantes entre estes dois géneros pode salientar-se, a forma da concha, mais arredondada nas *Ostrea sp.* e alongada nas outras, o tipo de fertilização, externa em *Crassostrea sp.*, enquanto que em *Ostrea sp.* as ostras incubam os ovos na cavidade branquial, sendo as brânquias neste último género, de maiores dimensões comparando com as ostras do outro (Galtsoff, 1964).

A ostra portuguesa, *Crassostrea angulata*, é de facto, desde há muito tempo, um recurso económica e ecologicamente muito importante. Esta espécie existiu em grande parte dos estuários e rias em Portugal, Ria de Aveiro, Mondego, Lagoa de Óbidos, Tejo, Sado, Lagoa de Albufeira, Mira, Ria de Alvor, Ria Formosa e Guadiana (Vilela, 1975; Ruano, 1997). A sua distribuição geográfica era descrita como tendo uma extensão desde a Bretanha até à costa de Marrocos, existindo também no Mar Mediterrâneo (Vilela, 1975). Até finais de 1970, teve

um papel comercial de enorme relevância na Europa, com grandes produções nos estuários do Tejo e Sado (Vilela, 1975). Em França foi a principal espécie de bivalve produzida até à década de 1970.

Entre 1960 e 1970, assistiu-se ao declínio e quase desaparecimento de *C. angulata*, devido a mortalidades em massa (Comps, 1988). Este declínio deveu-se sobretudo, segundo Vilela (1975), ao aumento da poluição. Poluição esta, relacionada com o crescimento populacional à volta das bacias dos grandes estuários, que por sua vez proporcionou o crescimento industrial, intensificação da agricultura e agro-pecuária, aliados ao tratamento de resíduos ineficaz ou até mesmo ausente (Ruano, 1997). Ao aumento de poluição, juntaram-se outros factores como a ocorrência de patologias graves nas ostras, como a “doença das brânquias” e a “doença do pé”, a exploração não controlada do recurso devido à falta de gestão, a falta de maternidades com produção de semente, entre outros (Ruano, 1997). Esta mortalidade provocou desaparecimento da ostra portuguesa no estuário do Tejo, comprovado em várias campanhas de amostragem executadas ao longo das últimas décadas, onde nunca foram encontrados espécimes desta ostra, e o fim da produção para fins comerciais no Sado (Ruano- comunicação pessoal).

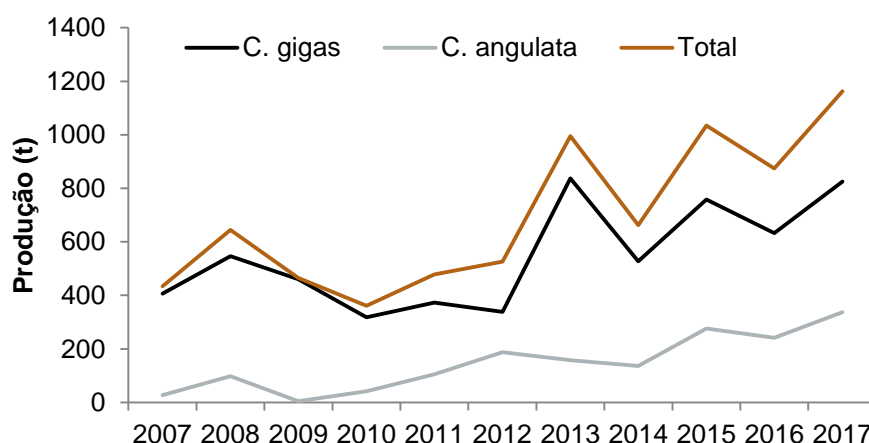
Face ao declínio de *C. angulata* na Europa e com o intuito de ultrapassar os prejuízos económicos causados pela mortalidade massiva, foi introduzida em França e rapidamente se dispersou por toda a Europa, a ostra gigante também denominada ostra do pacífico ou ostra japonesa, *Crassostrea gigas*. Esta rápida dispersão deveu-se maioritariamente ao facto desta espécie para além de ser morfologicamente idêntica a *C. angulata*, ter apresentado rápidas taxas de crescimento e mostrar-se resistente às doenças que provocaram a mortalidade da ostra portuguesa (Grizel & Héral, 1991). De facto, vários estudos mostram que para além de *C. gigas* apresentar taxas de crescimento mais rápidas que *C. angulata*, apresenta também potencialmente uma taxa de mortalidade menor que esta e uma resistência a doenças e/ou parasitas maior (Bougrier *et al.*, 1986; Huvet *et al.*, 2000; Soletchnik *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2007). Hoje em dia a produção de ostra na Europa baseia-se sobretudo na ostra do pacífico (FAO, 2019).

Ainda assim, algumas populações de *C. angulata*, resistiram à mortalidade massiva, bem como à introdução/dispersão de *C. gigas* (Batista, 2007). Atualmente a ostra portuguesa pode ser encontrada em ecossistemas estuarinos com grande incidência no estuário do Sado, existindo também no sul de Espanha até à costa de Marrocos (Fabioux *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2008). A sua distribuição é mais reduzida que no passado e em alguns destes locais partilha espaço com a sua congénere ostra japonesa. Na Europa as únicas populações puras onde até à data, não está descrita a ocorrência de *C. gigas*, e daí poderem ser considerados os santuários da ostra portuguesa são as populações do estuário

do Sado, do Mira e Cádiz (Fabioux *et al.*, 2002). Outras populações de ostra portuguesa foram também reportadas em Taiwan (Boudry *et al.*, 1998). De facto, *C. angulata* é também conhecida como “Fujian oyster” sendo das espécies mais produzidas, há mais de 2000 anos na China (Wang *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2012).

Desde há muito que se assumia que a ostra portuguesa seria nativa do sudoeste Europeu, tendo sido descrita inicialmente por Lamarck como tendo origem nesta zona geográfica. Em Vilela (1975) está descrito que o nome de “ostra portuguesa”, assim conhecida na Europa e outras partes do globo, poderá explicar-se por a espécie ter sido primeiramente ou principalmente conhecida em Portugal. Silva *et al.*, (2008) referem que *C. angulata* é nativa da costa Portuguesa. Contrariamente a estas descrições, supõe-se hoje, que a ostra portuguesa tenha uma origem asiática. A espécie terá sido introduzida na Europa através de vários eventos introdutórios, embora as origens exactas permaneçam desconhecidas (Boudry *et al.*, 1998; Foighil *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2010; Grade *et al.*, 2016).

A produção global de ostras (*C. gigas* e *C. angulata*), ultrapassa os 5 milhões de toneladas (5 544 245 t em 2017) sendo a China o maior produtor (FAO, 2019). Em Portugal, segundo a DGRM (2019), em 2017 foram vendidas 825 t de *C. gigas* e 337 t de *C. angulata*. A produção nacional de ostras tem ganho cada vez mais peso e importância económica, tendo a produção de ostra portuguesa um contributo cada vez maior para este crescimento (Figura 1.1.). A produção total de ostras em Portugal aumentou 17% de 2016 para 2017 (DGRM, 2019).



**Figura 1.1.** Produção de ostras do género *Crassostrea* em Portugal de 2007 a 2017 (DGRM, 2019).

Atendendo ao crescimento da produção de ostras em Portugal, é importante fazer a gestão do recurso tendo em conta a conservação da ostra portuguesa. Vários estudos sugerem que os “stocks” de *C. angulata* do nordeste atlântico, onde estão principalmente as populações



do estuário do Sado e Mira, são um recurso genético único que poderá beneficiar a ostreicultura nacional, no entanto estão permanentemente ameaçadas pela expansão da espécie do pacífico o que evidencia a importância de sua conservação (Huvet *et al.*, 2000; Fabioux *et al.*, 2002; Batista, 2007; Grade *et al.*, 2016). Por esta razão, estudos sobre aspetos ecológicos e biológicos de *C.angulata*, podem contribuir para a tomada de decisões de gestão e conservação deste recurso.

A ostra portuguesa é um molusco bivalve com uma notável importância mundial a nível económico, gastronómico e ecológico. Tal como muitos bivalves, esta espécie é um recurso alimentar de excelentes qualidades nutritivas cuja a procura e valor têm crescido nos últimos anos (Ruano, 2008).

A maior parte da produção desta ostra é obtida em viveiros e é comercializada em fresco, sendo a sua maioria para exportação (Silva *et al.*, 2008). Em Portugal, o cultivo da ostra portuguesa é feito maioritariamente na região do rio Sado, baseando-se sobretudo no crescimento e na engorda de juvenis em viveiro. A captação de ostra no seu ambiente natural é uma prática pouco recorrente nos dias de hoje, ao contrário do que sucedia no passado, até à década de 1970 (Vilela, 1975). A cultura é efectuada com semente proveniente de maternidades estrangeiras, principalmente de França, a um preço que torna o rendimento final limitado (Matias, 2008), ou menos rentável do que se existissem maternidades que comercializassem semente em Portugal.

A ostra portuguesa é uma espécie que pode ser encontrada em quase todos os tipos de substrato, e.g. substrato vasoso/lodoso mais ou menos duro, areia lamacenta, pedras, cascalho e misturas destes ou em diferentes materiais feitos pelo Homem, nas zonas intertidais dos estuários e rias (Ruano, 1997, Silva *et al.*, 2008). Podemos encontrar espécimes desde o baixo intertidal até ao subtidal, desde a boca dos estuários até largos quilómetros a montante (Ruano, 1997). A maioria dos bancos naturais/ostreiras localizam-se em zonas intertidais devido ao decréscimo da intensidade de corrente nas margens, que para além de permitir a sedimentação de materiais em suspensão, permite a fixação de larvas e a formação de bancos (Vilela, 1975; Freitas *et al.*, 2008). A distribuição espacial e a densidade das ostreiras dependem de vários factores locais, como a disponibilidade de substrato para fixação das larvas, a distribuição e intensidade das correntes no habitat, a salinidade e a temperatura do meio e a disponibilidade de alimento. Para além destes factores cruciais, existem outros ainda que podem ter influência nessa distribuição, como por exemplo, a rápida precipitação de materiais em suspensão; a proliferação de doenças; a existência e a propagação de organismos comensais e competidores; a pressão exercida pelos predadores naturais, como gastrópodes carnívoros, estrelas-do-mar, poliquetas, caranguejos, peixes e aves marinhas, sobre os indivíduos adultos, e as medusas sobre as

formas larvares; a pressão exercida pelo Homem devido à grande procura no mercado; e a poluição (Galtsoff, 1964; Ruano, 1997).

As ostras são muito resistentes a flutuações de temperatura e salinidade, flutuações essas, características dos ecossistemas onde vivem, as zonas de transição (estuários, rias e lagoas). Tal como outros organismos eurialinos, as ostras são capazes de viver em águas com grandes variações de salinidade e até, ainda que por curtos períodos, em valores de salinidade próximos de 0‰ (2-6‰) ou de 35-38‰, como a água do mar (Héral and Deslous-Paoli, 1991; Ruano, 1997). Estas ostras são também resistentes a temperaturas da água muito variáveis desde mínimos de 8-10 °C a máximos entre os 20 e os 30 °C (Ruano, 1997). O habitat destes organismos caracteriza-se por constantes flutuações dos seus parâmetros abióticos e está muitas vezes exposto a inúmeras pressões e como tal, as espécies aí existentes, nomeadamente as sésseis como as ostras, ficam expostas a factores particulares como por exemplo a exposição a níveis elevados de metais tóxicos e condições extremas dessecação (Varotto *et al.*, 2013; Cross *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014). Relacionado com esta exposição a elementos nocivos, as ostras desempenham um papel de extrema importância como bioindicador da qualidade ambiental (Vilela, 1975; Dias e Nunes, 1994; Pessoa *et al.*, 2000; Ruano, 2008; Cross *et al.*, 2014). A capacidade das ostras, para concentrarem no seu organismo elementos existentes no meio (bioacumulação), faz delas indicadoras dos níveis de contaminação do ecossistema onde habitam. Apesar da maioria dos bivalves bioacumularem no seu organismo, elementos do meio, as ostras mostram ser mais eficazes no papel de bioindicador, quando comparadas por exemplo com o mexilhão, *Mytilus galloprovincialis*, por se adaptarem à poluição por metais enquanto os mexilhões mostram ser mais sensíveis, estando ausentes de zonas mais contaminadas (Funes *et al.*, 2006). De facto, no estudo de Cross *et al.* (2014), os resultados revelam que a maioria dos polimorfismos genéticos observados em *C. angulata*, estão associados a processos de adaptação do seu genoma a stresses provocados por factores abióticos, como por exemplo a presença a elevadas concentrações de metais dando-lhe capacidades para sobreviver a condições abióticas típicas dos estuários.

Este trabalho enquadrou-se no âmbito do projeto CrassoSado, uma parceria entre o Instituto da Conservação da Natureza e Florestas - Reserva Natural do Estuário do Sado (ICNF-RNES), Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), Centro de Ciências do Mar e do Ambiente - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (MARE-UL) e Centro de Estudos do Ambiente e do Mar - Universidade de Aveiro (CESAM-UA), que surgiu no seguimento de medidas compensatórias previstas na Declaração de Impacte Ambiental do projeto “Nova fábrica de papel nas instalações de Setúbal da Portucel, S.A.”. Este projeto

teve como principal objetivo atualizar a informação sobre a ostra portuguesa no estuário do Sado e identificar e estudar os aspetos mais importantes para a conservação e a exploração sustentada da ostra no estuário do Sado.

## 1.2. Local de estudo

O estuário do Sado é o segundo maior estuário em Portugal com cerca de 24000 hectares (Caeiro *et al.*, 2005). Localizado na costa oeste de Portugal a cerca de 40km da capital, grande parte do estuário está classificada como reserva natural - Reserva Natural do Estuário do Sado (RNES), desde 1980 e protegido pela Convenção de Ramsar (ICNF, 2018) (Figura 1.2.).



**Figura 1.2.** Mapa representativo da Reserva Natural do Estuário do Sado (RNES) (ICNF, 2018).

Com uma extensão de cerca de 180km, o rio Sado tem uma orientação SE-NO, com nascente a sudoeste do concelho de Ourique a cerca de 232 m de altitude, recebendo influência das marés no último terço do seu curso, até um pouco a montante de Alcácer do Sal (Coutinho, 2003). O rio vai desaguar no oceano Atlântico através de um canal profundo entre a península de Tróia e a serra da Arrábida (Vilela, 1975; Ferreira *et al.*, 2003). A bacia

hidrográfica do estuário drena uma área de 7692 km<sup>2</sup> (Freitas *et al.*, 2008), e compreende profundidades médias que variam de 8m a 50m no canal de entrada (Caeiro *et al.*, 2005). O estuário ocupa uma área de cerca 160 km<sup>2</sup>, desde Alcácer do Sal até ao oceano Atlântico. Na zona central ou Baía do estuário, as curvaturas e bancos de areia intertidais existentes, diferenciam dois canais, um canal norte e um canal sul. O canal norte caracteriza-se por ter correntes mais fracas e o canal sul caracteriza-se por ser altamente dinâmico, predominando uma corrente vazante mais forte (Martins *et al.*, 2001; Coutinho, 2003; Caeiro *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2008). A baía compreende, ainda, uma vasta zona intertidal, onde se podem encontrar os esteiros da Marateca e da Comporta, sob influência de duas ribeiras com os mesmos nomes (Coutinho, 2003). O esteiro da Comporta prolonga-se pelo Canal de Alcácer que se pode considerar a transição entre as zonas límnic e estuarina, uma vez que recebe as águas do Rio Sado e de outras ribeiras de menor importância (Ruano e Dias, 1994; Coutinho, 2003). A zona do canal de Alcácer do Sal tem uma extensão aproximada de 20 km, largura média de 700 m e profundidade média de 5 m com diversas zonas de profundidades inferiores (Coutinho, 2003). O caudal proveniente do rio é bastante irregular, variando consideravelmente do Verão para o Inverno, o que está na origem de grandes flutuações interanuais (Coutinho, 2003; Ferreira *et al.*, 2003).

A circulação no estuário deve-se predominantemente ao efeito da maré, que é a força principal, uma vez que o caudal do rio tem uma influência menor no deslocamento da massa de água (Coutinho, 2003). De facto, a entrada de água doce pelo rio e seus tributários é considerada pequena comparando com o volume do estuário (Ferreira *et al.*, 2003). O caudal de renovação de água proveniente do oceano é inconstante e não é suficientemente forte para garantir uma corrente vazante capaz de dispersar os poluentes dissolvidos ou em suspensão nos meses em que o afluxo de água fluvial é menor (Vilela, 1975; Ruano e Dias, 1994). É por isso, um estuário particularmente sensível a fontes de poluição.

Apesar de grande parte do estuário estar protegido e inserido na Reserva Natural, representa um papel importante na economia local e nacional, acolhendo muitas indústrias, principalmente na sua margem norte. Apesar deste estatuto, o equilíbrio do sistema está permanentemente ameaçado pelas várias actividades humanas em toda a sua extensão. O estuário do Sado é um bom exemplo de um local onde as pressões humanas e os valores ecológicos chocam (Caeiro *et al.*, 2005). De facto são imensas as actividades inseridas na bacia do estuário do Sado associadas ao porto, à própria cidade de Setúbal, à existência de actividade mineira, particularmente no passado, na sua bacia hidrográfica e o intensivo uso da terra principalmente na produção de arroz (Ruano e Dias, 1994; Caeiro *et al.*, 2005). Na sua margem norte, concentram-se várias indústrias que utilizam a água do estuário para abastecimento e para descarga dos efluentes. Estas indústrias que estão associadas a

níveis de poluição elevados e que certamente têm impacto nas comunidades do estuário, pertencem aos sectores alimentar, da metalomecânica, química, agroquímica, produção de energia, cimentos, tintas e pasta de papel (Catarino *et al.*, 1987; Coutinho, 2003). As cidades de Setúbal e de Alcácer do Sal fazem também descargas de efluentes urbanos para o estuário. No entanto, existem várias ETAR nestes concelhos e nas referidas indústrias, minimizando o impacto destes efluentes. No canal de Alcácer do Sal, as pressões têm origem, principalmente, na agricultura intensiva (agroquímica) e na exploração mineira mais a montante. Esta região tem um grande historial de exploração de minas, estando exposta às descargas e infiltração no solo das águas residuais armazenadas nos poços de decantação, que contêm metais pesados como cobre, zinco, ferro e cádmio. De facto, foi observado que a montante do estuário, as minas de pirite são a principal fonte de metais pesados, nomeadamente de cádmio e de zinco e na zona da Baía Central, metais como o chumbo, cobre, crómio e níquel têm origem principal nas indústrias instaladas na margem norte. Já o canal da Marateca, apresenta níveis de contaminação por metais relativamente baixos (Cortesão e Vale, 1995).

O estuário do Sado apresenta uma riquíssima comunidade biológica, muito devido à elevada produção primária existente, dando sustento e permitindo o desenvolvimento de cadeias alimentares abundantes e diversificadas (Sequeira *et al.*, 2009). A sua localização geográfica permite que ocorram, simultaneamente, espécies com afinidades Norte-Atlânticas e espécies da região Mediterrânica. A comunidade ictiológica, apresenta elevada riqueza específica, tendo sido inventariadas mais de 100 espécies (Cabral, 1999). Quanto à comunidade de invertebrados existem no mínimo 592 espécies, das quais se destacam 228 de poliquetas, 193 de crustáceos, 81 de bivalves e, pelo menos, 4 de cefalópodes (dos Santos, 1998).

#### **1.2.1. A ostra portuguesa no Estuário do Sado**

O estuário do Sado é desde há muito um importante centro de produção natural de ostras. A ostra portuguesa do estuário do Sado foi, até à década de 1970, uma espécie muito importante na produção aquícola, tendo para isso, este estuário contribuído com as suas características ecológicas excelentes para o crescimento da espécie (Vilela, 1975; Dias, 1994; Ruano e Dias, 1994).

Existiam, no passado histórico, um significativo número de ostreiras com relevante importância no estuário do Sado, nomeadamente na Comporta, Carrasqueira, Ilha do Cavalo, Sachola, Longa, Monte da Pedra, Palma e Cachopos (Dias, 1994; Ruano e Dias, 1994). Em 1975, Vilela estimou que 4000 hectares de extensão do estuário seriam

ocupados ou destinados a estabelecimentos ostreícolas. De facto, os bancos naturais que antes ocupavam milhares de hectares, a partir da década de 1970, ficaram confinados à zona do canal de Alcácer, onde pequenos afloramentos com os escassos exemplares não garantiam uma exploração comercial (Dias, 1994; Ruano, 1997). Tradicionalmente, as zonas com ostras localizadas mais a montante no canal de Alcácer (Cachopos e Monte da Pedra), sempre foram consideradas de menor qualidade, comparativamente com os bancos mais próximos da zona da Baía Central (Murta, Abúl, Carrasqueira, Rabo de Bacalhau ou Ilha do Cavalo). No entanto, foram os bancos mais a montante que se mantiveram ativos e os únicos onde, durante vários anos, foi possível observar o recrutamento da espécie (Ruano- comunicação pessoal). As pressões antropogénicas, que levaram ao aumento de poluição foram o grande factor impulsionador para a queda da actividade ostreícola do estuário do sado (Vilela, 1975; Ruano, 1997).

Nos últimos 20 anos aproximadamente, tem-se registado a gradual recuperação das ostras na zona do canal de Alcácer, bem como a sua expansão para montante, onde anteriormente não tinham sido identificadas (Dias, 1994; Anónimo, 2016). Simultaneamente, nos estudos desenvolvidos pelo projeto Crassosado, também se observou alguma recuperação nas zonas da Carrasqueira (Anónimo, 2016). A melhoria significativa das condições ambientais do meio poderá ter sido a causa principal para a recuperação. Atualmente são aplicadas várias medidas ambientais e planos de gestão a estuários nacionais pela Agência Portuguesa do Ambiente (APA) e pelo Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF), com o intuito de proteger e recuperar habitats e populações de espécies protegidas ou ameaçadas, valorizar as suas particularidades ambientais, gerir os recursos e assegurar a sustentabilidade dos ecossistemas estuarinos. No entanto, tem-se assistido a uma forte pressão no sentido de reforçar a introdução da ostra do Pacífico, *C. gigas*, sobretudo no estuário do Sado, mas também no estuário do Mira, à semelhança do que aconteceu noutras zonas da costa portuguesa, nomeadamente na Ria Formosa e na Ria de Aveiro. O conhecimento de base para apoiar a tomada de decisão sobre o licenciamento destas introduções é ainda deficitário, em particular no que diz respeito ao estado atual das populações de *C. angulata* e às condições que influenciam o sucesso do recrutamento.

### **1.3. Objetivos**

Sendo a ostra portuguesa, *C. angulata*, um recurso genético único, com crescente expressão económica, e havendo evidência da sua recuperação e aparecimento de bancos naturais, mas também a constante ameaça e pressão para a introdução de *C. gigas*, a

finalidade deste estudo é aprofundar a biologia e ecologia da espécie no estuário do Sado, para estruturar a conservação e gestão sustentada deste recurso. Esta finalidade será atingida em parte, através do estudo do ciclo reprodutivo e do estado sanitário das ostras, através da concretização dos seguintes objetivos:

- a) Analisar a evolução temporal, do ciclo reprodutivo de espécimes adultos de ostra portuguesa, num banco natural do estuário do Sado;
- b) Identificar o estado de desenvolvimento das gónadas, de acordo com uma escala qualitativa de classificação microscópica e através da determinação da dimensão da gónada relativamente aos restantes tecidos (análise da percentagem da superfície ocupada pela gónada nas preparações histológicas);
- c) Relacionar a evolução temporal do estado de desenvolvimento das gónadas e a sua percentagem de ocupação nas ostras em relação com os parâmetros ambientais, temperatura e salinidade;
- d) Identificar lesões e agentes patogénicos em espécimes adultos de ostra portuguesa de um banco natural e de um viveiro do estuário do Sado por observação macro e microscópica;
- e) Comparar o estado sanitário nas ostras provenientes de um banco natural e de um viveiro do estuário do Sado;
- d) Construção de um novo índice para realizar a avaliação e quantificação das lesões, alterações morfológicas e parasitas em ostras, para futura utilização na monitorização de rotina tornando a avaliação do estado sanitário menos subjetiva.

## **CAPÍTULO 2.**

# **CICLO REPRODUCTIVO**

---



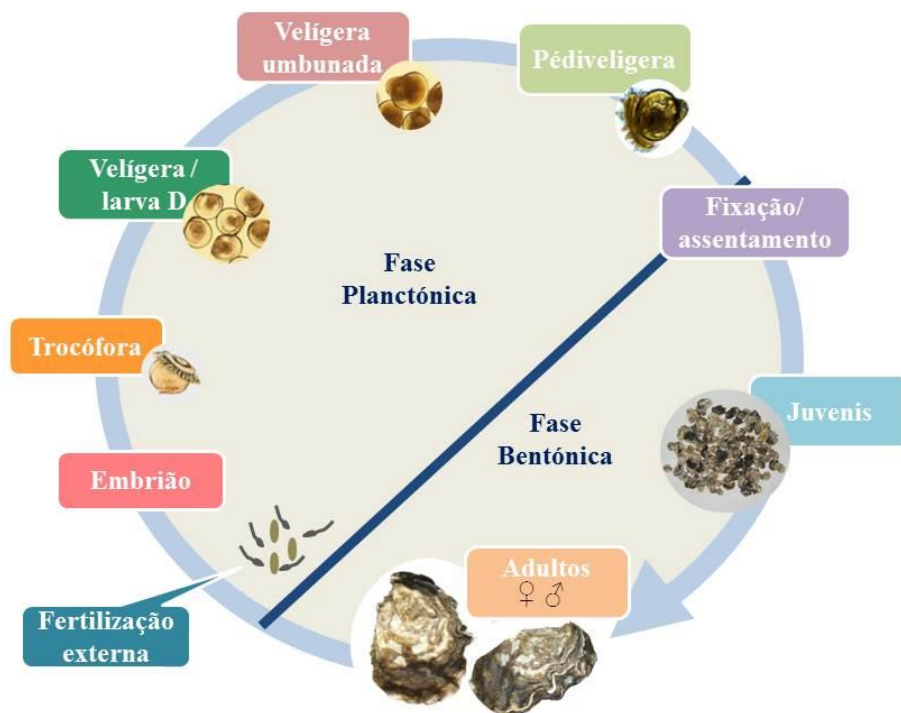
## 2. Ciclo reprodutivo

### 2.1. Enquadramento

O ciclo de vida da ostra portuguesa, *Crassostrea angulata*, apresenta duas fases, uma fase planctónica ou fase larvar, e uma fase bentónica ou fase metamórfica, juvenil e adulta. É uma espécie com fecundação externa, libertando os gâmetas na coluna de água. Dentro do mesmo género, o número de gâmetas libertados na desova pode variar, *e.g.*, *C. gigas* pode chegar a libertar mais de 100 milhões de oócitos (Galtsoff, 1964), já *C. angulata* parece libertar um número menor (Vilela, 1975). Após a fecundação as larvas passam por vários estados planctónicos até atingirem o estado “pediveligera” onde procuram o substrato ideal para se fixarem, dando-se o assentamento e posterior metamorfose que as adapta a uma vida bentónica e sésil sob a forma de pós-larva assentada, juvenil ou semente (a plantígrade) (Galtsoff, 1964; Chícharo, 1996) (Figura 2.1.). A duração da fase planctónica depende, em grande parte, do sucesso da procura do substrato de fixação, mas também de fatores ambientais, como a temperatura e a disponibilidade de alimento, que afetam a sobrevivência e a rapidez do crescimento das larvas (Chícharo, 1996; Rico-Villa *et al.*, 2009; Pouvreau *et al.*, 2015).

Na fase adulta a ostra é dióica, isto é, os sexos são normalmente separados, embora exista uma pequena percentagem de indivíduos com hermafroditismo simultâneo (Amemiya, 1925; Pascual, 1971; Vilela, 1975; Steele e Mulcahy, 1999). Espécimes de *C. angulata* hermafroditas em simultâneo apresentam no mesmo túbulo gonadal oócitos e espermatozóides (Amemiya, 1925). Os indivíduos de *C. angulata*, bem como outros do mesmo género, são descritos principalmente como sendo hermafroditas alternativos, uma vez que podem mudar de sexo uma ou mais vezes ao longo da vida (Galtsoff, 1964; Le Dantec, 1968). Pensa-se que a proporção entre sexos nas populações de *C. angulata* e em outras do mesmo género, depende da idade de cada ostra e que em grupos mais velhos, as fêmeas são geralmente dominantes (Guo *et al.*, 1998). Existem estudos que descrevem diferentes rácios sexuais destas espécies (Le Dantec, 1968; Vilela, 1975; Lango-Reynoso, 1999; Steele e Mulcahy, 1999). A determinação do sexo nas ostras parece não estar relacionada somente com aspectos genéticos, mas também com factores ambientais e demográficos (Le Dantec, 1968; Buroker, 1983; Guo *et al.*, 1998). Regra geral, estas ostras são protândricas, desenvolvendo-se a primeira vez como machos. A maturação sexual pode dar-se antes de completado o primeiro ano de idade.

Até atingir a fase de desova as gónadas das ostras passam por diversos estados de desenvolvimento/maturação. A gametogénese, ou seja, o desenvolvimento e proliferação dos gametas sexuais, ocorre dentro dos folículos gonadais. As primeiras células germinais diferenciadas são as ovogónias nas fêmeas e espermatogónias nos machos. Estas células desenvolvem-se no epitélio germinal e dividem-se intensamente por mitoses. Diferenciam-se em oócitos/ovócitos e espermatócitos primários, que através de meioses sucessivas, se diferenciam em oócitos em início de vitelogénese e por sua vez em oócitos maduros e espermatócitos secundários, em espermatídeos e espermatozóides (Gosling, 2003).



**Figura 2.1.** Esquema representativo do ciclo reprodutivo de *Crassostrea angulata*.

O período de maturação sexual e libertação dos gametas não é igual de ano para ano nem de local para local (Vilela, 1975). Tal como o desenvolvimento larvar, a gametogénese e consequente desova, dependem de factores exógenos e de factores endógenos (genéticos e hormonais). Dos factores exógenos, a temperatura, a salinidade e a abundância ou escassez de alimento, são os que mais se destacam (Deslous-Paoli, 1982; Muranaka e Lannan, 1984; Chávez-Villalba *et al.*, 2003). Grandes alterações nos factores ambientais poderão inclusivamente impedir a desova de um ano (Pouvreau *et al.*, 2015). De todos os factores ambientais, a temperatura da água parece ser o que mais influencia o ciclo reprodutivo (Vilela, 1975; Le Dantec, 1968; Shumway, 1996). Existe um intervalo de temperatura óptimo para ocorrência da gametogénese, que depende de cada espécie. Fora

desse intervalo a taxa de sucesso da gametogénese é fortemente reduzida ou mesmo interrompida. Temperaturas baixas da água parecem não favorecer o desenvolvimento dos gâmetas (Mann, 1979). Por outro lado temperaturas muito elevadas também podem prejudicar a gametogénese (Lubet, 1994). O estudo de Chávez-Villalba *et al.* (2003) sugere que o início da gametogénese, não depende apenas da temperatura, mas também das substâncias de reserva em *stock*. Já o papel da salinidade no ciclo reprodutivo da ostra não é bem conhecido, no entanto, pensa-se que salinidades baixas podem provocar a diminuição ou mesmo impedir a desova e o desenvolvimento dos gâmetas (Muranaka e Lannan, 1984; Shumway, 1996). A produção e desenvolvimento das gónadas podem ser também influenciados pela poluição ambiental (Lowe and Pipe, 1986; Roper *et al.*, 1991; Steele e Mulcahy, 1999) e pela carga de parasitas (Steele and Mulcahy, 1999; Vaschenko *et al.*, 2013).

A reprodução é um dos processos fisiológicos com maior importância no ciclo de vida de qualquer espécie. O estudo do ciclo reprodutivo de ostras do género *Crassostrea sp.*, principalmente de *C. gigas* e de *C. virginica*, a ostra americana, tem sido alvo de grande interesse um pouco por todo o mundo (Mann, 1979; Barber, 1996; Steele e Mulcahy, 1999; Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Chávez-Villalba *et al.*, 2007). A prática comum para estudar a biologia das ostras é fazerem-se observações microscópicas diretas nos seus tecidos moles (Flahauw *et al.*, 2012). Vários métodos são utilizados para a avaliação do estado das gónadas, no entanto a análise de preparações histológicas parece ser a mais comum. Dentro destes, há estudos que avaliam o estado das gónadas de uma forma qualitativa (Vilela, 1975; Mann, 1979; Steele e Mulcahy, 1999; Vaschenko *et al.*, 2013). Outros, são mais complexos e para além de avaliarem qualitativamente as gónadas das ostras, fazem uma avaliação quantitativa, medindo a proporção ocupada pelo tecido gonadal em relação ao resto dos tecidos (Fabioux *et al.*, 2005; Enríquez-Díaz *et al.*, 2009; Flahauw *et al.*, 2012; Dridi *et al.*, 2014). Lango-Reynoso *et al.* (2000) mediram o diâmetro dos oócitos para avaliar o desenvolvimento da gametogénese. O método mais usado para determinar o volume da gónada ou o espaço que esta ocupa numa ostra é medindo a área que a mesma ocupa através de preparações histológicas (Fabioux *et al.*, 2005). Os métodos qualitativos, tendo como base a classificação de estados de desenvolvimento através de uma escala, resultam muitas vezes de uma avaliação subjetiva. Para ultrapassar essa subjetividade e para evitar alguns lapsos de interpretação e perda de informações, este tipo de métodos complementam-se com métodos quantitativos como medir áreas gonadais e oócitos (Heffernan e Walker, 1989; Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2003; Fabioux *et al.*, 2005; Normand *et al.*, 2008; Royer *et al.*, 2008; Enríquez-Díaz *et al.*, 2009; Flahauw *et al.*, 2012; Dridi *et al.*, 2014).

Relativamente à sazonalidade na reprodução, a ostra portuguesa caracteriza-se por ter um ciclo reprodutivo complexo e amplo que se estende desde a Primavera ao Outono, com máxima atividade no final da Primavera e Verão (Silva *et al.*, 2008). Matias (2008) refere que em Portugal, as ostras estão sexualmente maduras de Março a Setembro e têm picos de desova entre Março/Abril e em Setembro. Segundo Vilela (1975), autor do estudo mais importante e abrangente sobre o ciclo reprodutivo da ostra portuguesa, em ambiente natural, nos estuários do Tejo e do Sado, as ostras estão sexualmente maduras de Junho a Agosto. Já a libertação de gâmetas ocorre, principalmente, entre Maio e Outubro. No Outono a maior parte das ostras, já concluiu a postura. A intensidade da postura varia de ano para ano, sendo maior entre Junho e Agosto. Há anos em que existem dois picos de desova que coincidem com o Verão e com o Outono, respetivamente. Vilela (1975) fala da possibilidade de algumas ostras efectuarem duas posturas num ano, uma no início da época e outra no final, separados por 6 meses.

Em Portugal, são poucos os estudos sobre o ciclo reprodutivo de *C. angulata*, em meio natural, nos locais onde esta existe em forma pura (sem a presença de *C. gigas*). De facto o mais abrangente estudo até à data foi o de Vilela (1975), como já referido anteriormente. O conhecimento de todo o processo desde o início da formação dos gâmetas até à desova e consequente reabsorção é crucial não só para a conservação e gestão sustentada do recurso, como também para o apoio ao sector ostrícola. Do conhecimento da época reprodutiva, nomeadamente da altura aproximada da desova, depende o êxito da captação de semente (ostra assentada), um dos passos mais importantes da exploração ostrícola.

A finalidade do estudo do ciclo reprodutivo, apresentado neste capítulo, foi determinar a sua evolução ao longo de um ano, em ostras adultas de um banco natural do estuário do Sado, denominado de banco natural Batalha. Para alcançar esse objetivo, procedeu-se à determinação do estado de desenvolvimento das gónadas segundo uma escala qualitativa, através da visualização de lâminas histológicas e à determinação da dimensão da gónada relativamente aos restantes tecidos moles, analisando a percentagem, da superfície de ocupação da mesma, também em preparações histológicas. Por fim, avaliou-se a evolução temporal do estado de desenvolvimento das gónadas e a percentagem de ocupação destas em relação aos outros tecidos moles, com os parâmetros ambientais temperatura e salinidade.

## **2.2. Metodologia**

### **2.2.1. Amostragem**

Foram feitas amostragens mensais entre Março de 2015 e Março de 2016, em que foram colhidos aleatoriamente 30 indivíduos adultos de *C. angulata* num banco natural do canal de Alcácer, numa zona denominada de Batalha. Este banco foi escolhido tendo em conta a sua dimensão e estado, pois é relativamente recente e encontra-se em bom estado, apresentando crescimento dos indivíduos e sem mortalidades observadas. É um banco de uma dimensão razoável, comparando com pequenos afloramentos ao longo do estuário.

Nas campanhas para obtenção das amostras, foi utilizada uma embarcação da Reserva Natural do Estuário do Sado (RNES/ICNF).

### **2.2.2. Trabalho laboratorial**

No laboratório, as amostras foram lavadas e a dimensão máxima de cada indivíduo foi medida e registada. Depois de se registarem as observações sobre o estado geral (cor, aspeto) de cada ostra, seguiu-se o processamento histológico até obtenção das lâminas para análise microscópica.

As preparações histológicas seguiram a metodologia adotada neste tipo de trabalhos (Howard e Smith, 1983). Para cada espécimen, recolheu-se uma peça na zona central do corpo, através de um corte transversal com cerca de 1 cm de largura, afastado da extremidade anterior cerca de 2 cm, por forma a recolher a maior extensão possível das principais estruturas orgânicas (glândula digestiva, brânquias, manto, gónada e nefrónio). Cada peça recolhida foi identificada com um código e colocada em fixador “Davidson” (Shaw e Battle, 1957), no mínimo 48 horas. Após a fixação as peças foram “lavadas” com fio de água corrente durante um dia, retirando assim o excesso de fixador. Seguiu-se a desidratação e a inclusão: passagem por etanol de concentrações crescentes até 100% e por fim impregnação em xilol de forma a ficarem desidratadas para a sua inclusão em parafina. Após a inclusão das peças em parafina, procedeu-se aos cortes. Estes foram realizados num micrótomos de correção, com uma espessura de 3-5µm, subsequentemente estendidos em banho-maria e recuperados na lâmina. As lâminas com os cortes foram colocadas numa estufa a 65 °C, de forma a retirar o excesso de parafina. As lâminas foram depois coradas com Hematoxilina-Eosina, seguindo o procedimento clássico de desparafinação, hidratação, coloração, desidratação e montagem. Através da observação das lâminas histológicas ao microscópio óptico, o sexo das ostras e o estado de desenvolvimento das gónadas foram determinados e registados. Os estados de desenvolvimento gametogénico nas ostras estudadas foram classificados segundo uma

escala com 6 níveis, adaptada da classificação de Mann (1979) e Steele e Mulcahy (1999) e estão descritos na tabela 1.

Para a medição da área ocupada pelas gónadas das ostras em relação aos restantes tecidos, seguiu-se o método descrito por Fabioux *et al.*, (2005). As lâminas com os cortes histológicos foram digitalizadas com um scanner “Epson Perfection 4990 PHOTO”, e a área total da gónada em relação à área dos tecidos foi medida com o programa ImageJ. A percentagem da área foi estimada em pixéis.

**Tabela 2.1.** Escala de classificação de estados de desenvolvimento de gónadas de ostras do género *Crassostrea* sp. (adaptada de Mann, 1979 e Steele e Mulcahy, 1999); (M-machos; F- fêmeas).

0	Indiferenciado	Sem evidência da presença de folículos periféricos à glândula digestiva.	
1	Desenvolvimento (fraca actividade)	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>Muitos folículos pequenos; numerosas espermatogónias e espermatócitos. Sem espermatozóides.</li> </ul>
		F	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oogónias resultantes das células germinativas ao longo do folículo;</li> <li>Tecido conjuntivo abundante;</li> <li>Sem oócitos livres.</li> </ul>
2	Desenvolvimento (actividade avançada)	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células dos folículos com espermátides e espermatozóides;</li> <li>Característico padrão de movimento “swirling” dos espermatozóides, com caudas direccionadas para o lúmen do folículo.</li> </ul>
		F	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oócitos livres e outros ainda fixos à parede do folículo;</li> <li>Oócitos com núcleo distinto e mais claro que o citoplasma.</li> </ul>
3	Gónada madura	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tecido inter-folicular e epitélio germinativo imperceptíveis;</li> <li>Folículos com espermatozóides orientados com caudas para o lúmen do folículo formando o padrão “swirling” que preenche completamente o folículo.</li> </ul>
		F	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oócitos livres com núcleo e nucléolo distintos.</li> </ul>
4	Desova	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>Folículos parcialmente vazios;</li> <li>Evidência de espermatozóides nos ductos e câmara paleal;</li> <li>Pode haver muitos espermatozóides mas não densamente compactados;</li> <li>Algumas células fagocitárias.</li> </ul>
		F	<ul style="list-style-type: none"> <li>Elevado número de oócitos livres mas não densamente compactados, ocupando o centro do lúmen no folículo;</li> <li>Paredes foliculares parecem partidas e os folículos vazios; oócitos maduros nos ductos e câmara paleal;</li> <li>Alguns fagócitos presentes.</li> </ul>
5	Pós-desova/	M	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tecido conjuntivo entre os folículos colapsados;</li> </ul>

	Reabsorção		<ul style="list-style-type: none"> <li>• As células germinais no lúmen estão citolisadas;</li> <li>• Elevado número de fagócitos;</li> <li>• Alguma infiltração hemocitária nos folículos;</li> <li>• Espermatócitos continuam densamente nos folículos.</li> </ul>
		F	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tecido conjuntivo está aparentemente nos folículos;</li> <li>• Folículos colapsados e pequenos;</li> <li>• Elevado número de fagócitos;</li> <li>• Oócitos residuais em processo de citólise.</li> </ul>

### 2.2.3. Parâmetros ambientais: temperatura e salinidade

Para o registo de temperatura e salinidade fez-se a monitorização contínua, através de um sensor “CTD Star Oddi” fundeado no estuário do Sado. Trata-se de um sensor de auto-registo com periodicidade de 10 em 10 minutos, instalado num dos pilares da ponte ferroviária sobre o Canal de Alcácer, junto ao banco ostreícola Batalha (montante) e relativamente perto do banco Monte da Pedra (mais a jusante), em Março de 2015. O sensor foi periodicamente visitado para limpeza da amarração e para descarregar os dados gravados. Esta monitorização foi importante para o estudo da relação com os dados da reprodução (e.g. temperaturas e salinidades a que começam a aparecer ostras maduras ou em desova). Os registos de temperatura do ar foram obtidos na estação meteorológica de Alcácer do Sal – IPMA.

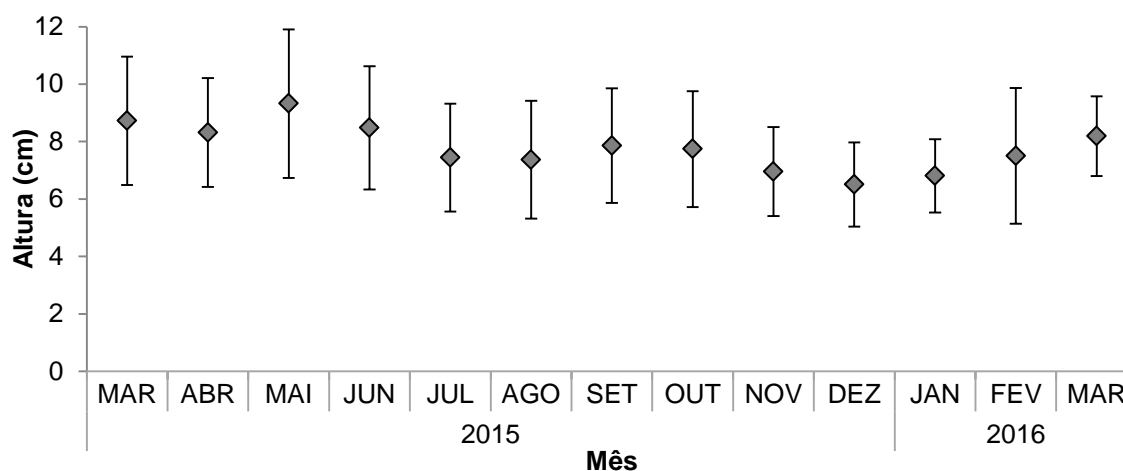
### 2.2.4. Análise de dados

Para analisar a evolução, dos estados de desenvolvimento das gónadas e para comparar as proporções entre sexos dos espécimes ao longo dos meses, recorreu-se ao teste – G de independência com o auxílio do software Rstudio V 0.99.842 (RStudio, Inc.). Este teste é utilizado quando se quer testar se as proporções de uma variável são diferentes para diferentes valores da outra variável (McDonald, 2014).

Para analisar a evolução temporal da dimensão da gónada relativamente aos restantes tecidos entre cada estado de desenvolvimento e também entre sexos, aplicou-se uma análise de variância (ANOVA) a um factor, tendo cumprido os pressupostos do teste, caso contrário, aplicaram-se testes não paramétricos (Kruskal-Wallis). Os testes de variância foram realizados com o auxílio do software Systat Software, Inc. SigmaPlot for Windows, versão 12.5.

### 2.3. Resultados

No período de amostragem foram analisados 389 indivíduos de ostra portuguesa, 30 indivíduos por cada mês de amostragem, com a exceção do mês de Dezembro (n=29). A altura média das ostras recolhidas no período de estudo foi de 7,79 cm  $\pm$  2,07 cm (figura 2.2.). Observou-se e registou-se o sexo e o estado de desenvolvimento das gónadas das amostras em cada mês de amostragem (Tabela 2.2 e Figura 2.3.).



**Figura 2.2.** Altura média das ostras (em cm) recolhidas entre Março de 2015 e Março de 2016, no banco Batalha para o estudo do ciclo reprodutivo.

#### 2.3.1. Proporção entre sexos e estados de desenvolvimento

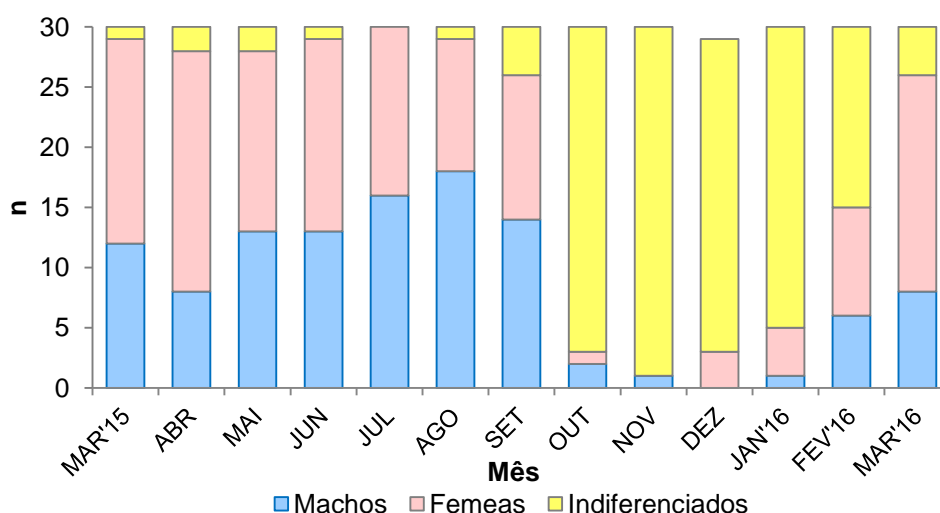
Em todos os meses, à exceção do mês de Julho, foram observados indivíduos com sexo indiferenciado, ou seja indivíduos que não se encontram a desenvolver qualquer tipo de células sexuais, não se conseguindo determinar se são machos ou fêmeas. Analisando estatisticamente o rácio sexual (número de fêmeas: número de machos: número de indiferenciados) através do teste G de independência, pode-se afirmar que há diferenças na proporção sexual entre os meses de amostragem ( $p < 0,001$ ).



**Tabela 2.2.** Tabela resumo dos estados de desenvolvimento das gónadas e rácio sexual das ostras recolhidas entre Março de 2015 e Março de 2016, no banco Batalha para o estudo do ciclo reprodutivo (F-Fêmeas; M- Machos; I- Indiferenciados).

		2015										2016		
	Mês	Mar	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR
	n	30	30	30	30	30	30	30	30	30	29	30	30	30
	F:M:I	17:12:1	20:8:2	15:13:2	16:13:1	14:16:0	11:18:1	12:14:4	1:2:27	0:1:29	3:0:26	4:1:25	9:6:15	18:8:4
Estados de maturação	0	1	2	2	1	0	1	4	27	29	26	25	15	4
	I	13	4	0	0	0	0	0	0	0	2	3	8	15
	II	15	9	0	1	0	0	3	1	0	0	2	7	6
	III	1	8	7	11	10	4	2	0	0	0	0	0	5
	IV	0	5	14	15	20	14	5	0	0	0	0	0	0
	V	0	2	7	2	0	11	16	2	1	1	0	0	0

De Outubro de 2015 a Fevereiro de 2016 registou-se um número maior de indivíduos com o sexo indiferenciado comparando com o número de machos e fêmeas analisados em cada mês. Nos meses de Março (2015 e 2016), Abril, Maio e Junho as fêmeas estiveram em maioria, já nos meses de Julho, Agosto e Setembro, foram encontrados mais espécimes machos. O maior número de indivíduos do sexo masculino foi encontrado no mês de Agosto (n=18) e o maior número de fêmeas foi registado no mês de Abril (n=20) (Figura 2.3.).



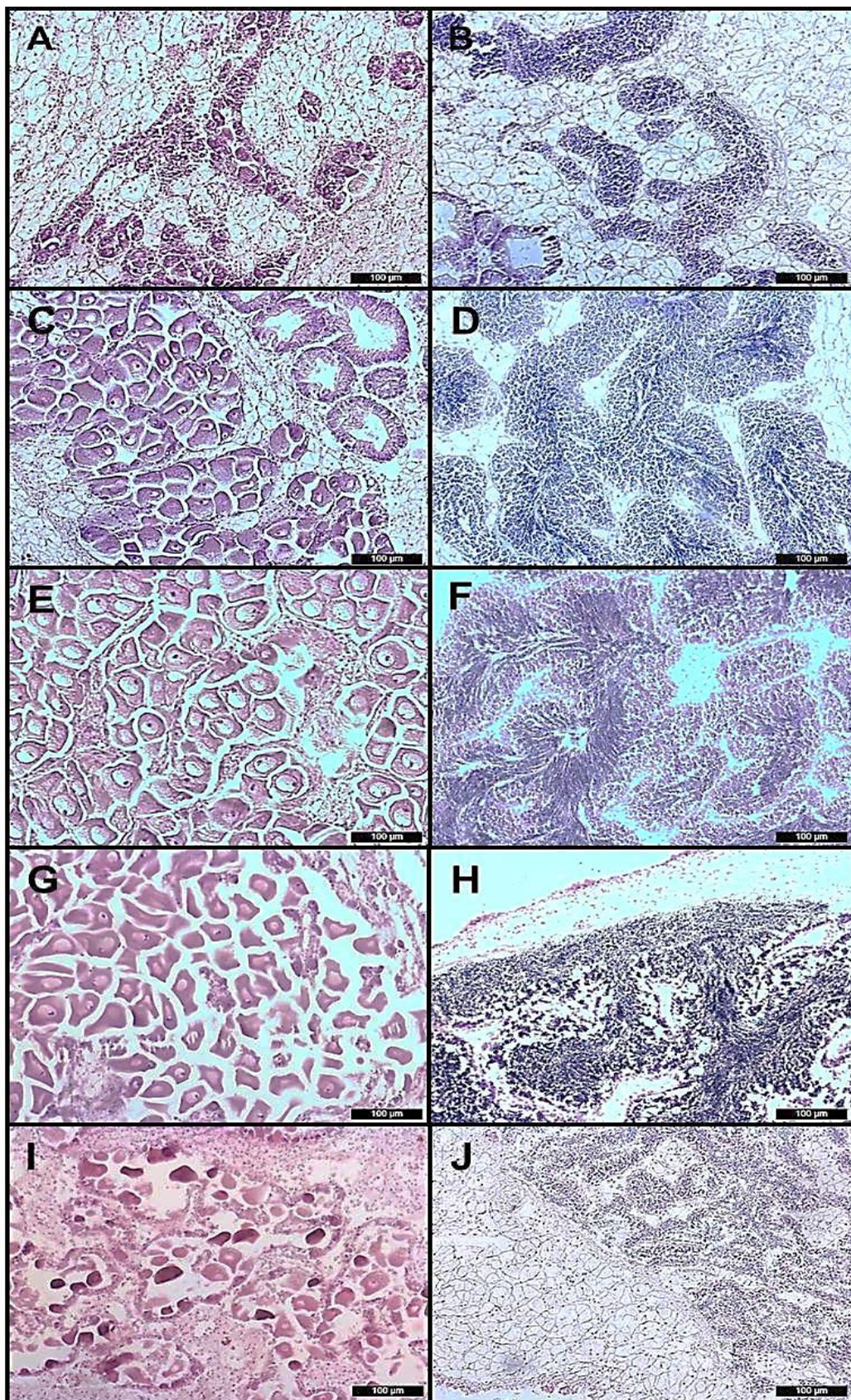
**Figura 2.3.** Variação mensal do sexo das ostras recolhidas entre Março de 2015 e Março de 2016, no banco Batalha para o estudo do ciclo reprodutivo.

Para a caracterização do ciclo reprodutivo da ostra portuguesa, efetuou-se a classificação dos estados de desenvolvimento das gónadas dos indivíduos recolhidos (Tabela 2.2 e Figura 2.5.).

Ambos os sexos mostraram sincronismo no desenvolvimento da gónada, acompanhando em simultâneo os mesmos estados de desenvolvimento.

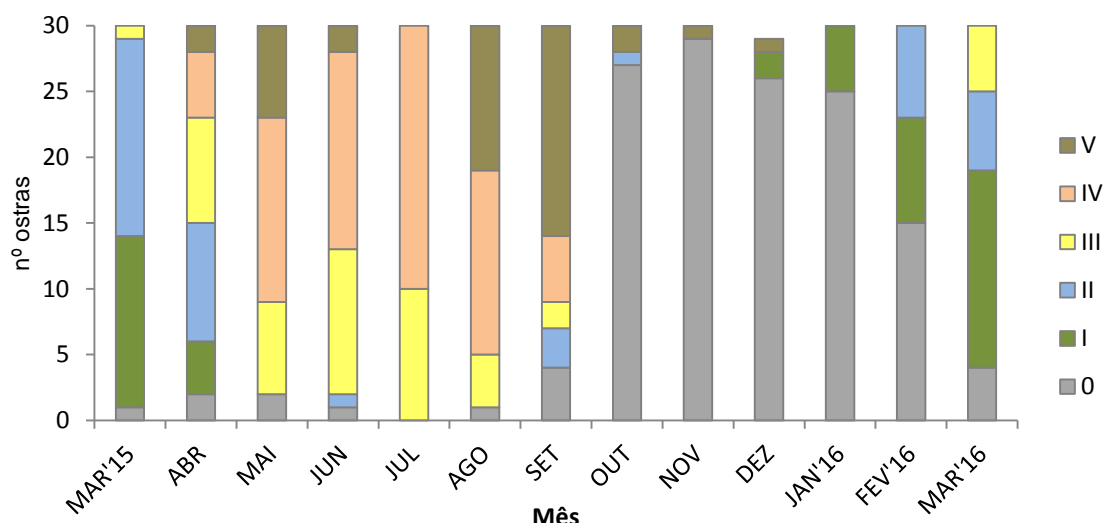
A proporção de indivíduos em cada estado de maturação é estatisticamente diferente entre os meses analisados ( $p < 0,001$ ). Observou-se que no início do período de estudo os indivíduos se encontravam em fase de preparação para a reprodução, pois a grande maioria encontrava-se nos estados I e II de desenvolvimento, embora tenham sido observados já em Março e Abril indivíduos nos diversos estados. Os meses com maior número de indivíduos maduros (estado III) foram Junho e Julho. A desova registou-se do mês de Abril a Setembro, observando-se um grande aumento de indivíduos neste estado de Abril para Maio, até Julho, e começando a decrescer a partir de Agosto. O pico de desova (estado IV) foi observado em Julho, mês onde apenas foram identificadas ostras no estado III e IV. De Outubro até Março de 2016, não foram observados indivíduos em desova (Tabela 2.2 e Figura 2.5.).





**Figura 2.4.** Gónadas de fêmea (A,C,E,G,I) e de macho (B,D,F,H,J) em diferentes estados de desenvolvimento de *Crassostrea angulata* do banco natural Batalha, do estuário do Sado. Estado I (A, B), estado II (C,D), estado III (E,F), estado IV (G,H), estado V (I,J).

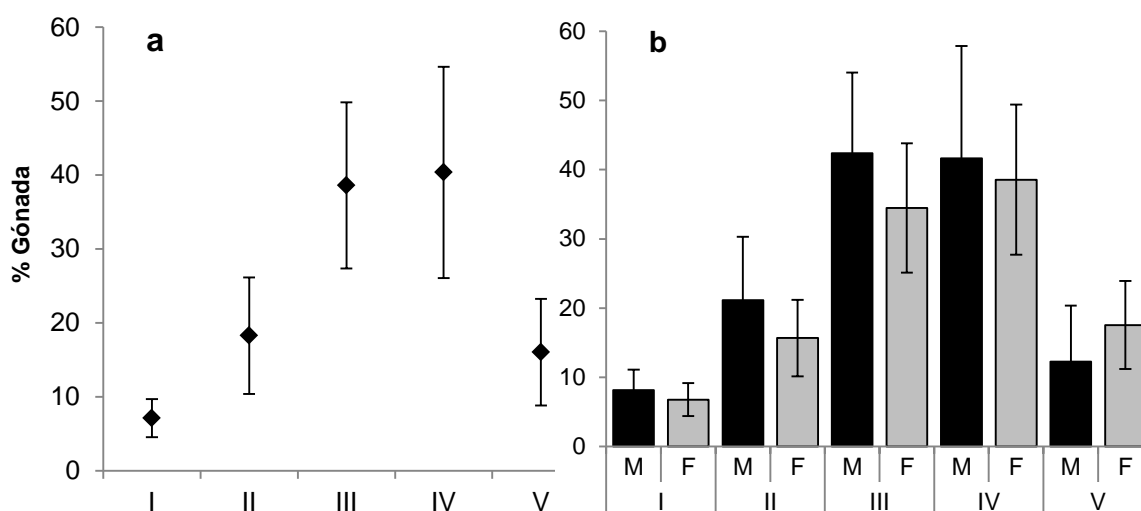




**Figura 2.5.** Estados de maturação das ostras recolhidas entre Março de 2015 e Março de 2016, no banco Batalha para o estudo do ciclo reprodutivo.

### 2.3.2. Área de ocupação da gónada

Nas amostras recolhidas ao longo do período de amostragem os valores médios de área ocupada pela gónada em relação aos restantes tecidos moles das ostras foram no estado I de  $7,1 \pm 2,6$ , no estado II de  $18,3 \pm 7,9$ , no estado III de  $38,8 \pm 11,2$ , no estado IV de  $40,4 \pm 14,3$  e por fim, no estado V de  $16,0 \pm 7,2$ . Os maiores valores de área ocupada pela gónada foram então observados nos estados III ( $42,4 \pm 11,7\%$  e  $34,5 \pm 9,4\%$  para machos e fêmeas respectivamente) e IV ( $41,6 \pm 16,3\%$  e  $38,6 \pm 10,8\%$  para machos e fêmeas respectivamente) onde praticamente quase metade do corpo dos indivíduos estava ocupada por tecido reprodutivo (Figura 2.6). Os menores valores de área ocupada pela gónada, foram observados no estado I com  $8,2 \pm 3,0\%$  e  $6,8 \pm 2,4\%$  para machos e fêmeas respectivamente. Estatisticamente, existem diferenças significativas nos valores médios das áreas ocupadas pelas gónadas entre os diferentes estados de maturação ( $p < 0,001$ ), excepto entre os estados III e IV (gónada madura e em desova) e entre os estados II e V (gónada em desenvolvimento e em pós – desova) (Figura 2.6.a). Relativamente às diferenças na percentagem de área ocupada pela gónada entre machos e fêmeas em cada estado de desenvolvimento, verificou-se que nos estados I e IV não foram encontradas diferenças nos valores médios da área gonadal entre os dois sexos ( $p > 0,05$ ). Nos restantes estados essas diferenças mostraram-se estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Outra observação que se pode apontar é o facto da percentagem ocupada pela gónada ser quase sempre superior nos machos, excepto no estado V (Figura 2.6.b)

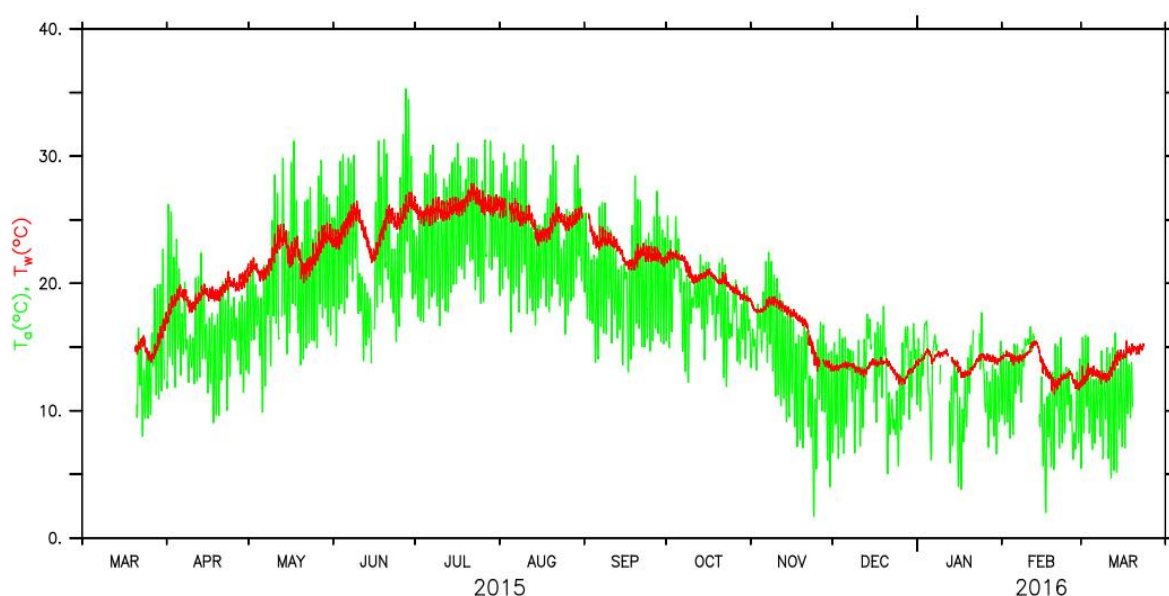


**Figura 2.6.** Percentagem média de área ocupada pela gónada em cada estado de desenvolvimento no total dos indivíduos (a) e percentagem média de área ocupada pela gónada em cada estado de desenvolvimento com a diferenciação por por sexo (b), das ostras recolhidas entre Março de 2015 e Março de 2016, no banco natural. M- machos; F- fêmeas.

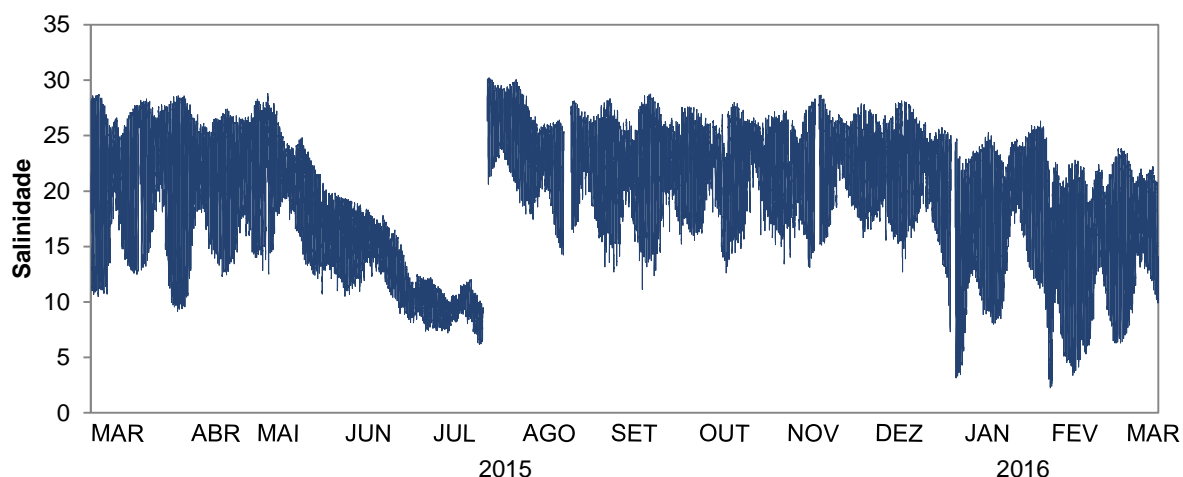
### 2.3.3. Parâmetros ambientais: temperatura e salinidade

Analysaram-se os dados de temperatura e salinidade recolhidos ao longo do período de amostragem com o objetivo de relacionar o desenvolvimento da gónada de ostra portuguesa no estuário do Sado. Estas medições contínuas permitiram caracterizar a evolução destas variáveis ao longo do período de estudo. No local onde o sensor foi colocado, perto do banco natural em estudo e junto aos bancos de ostras atualmente mais relevantes, os valores de temperatura na coluna de água revelaram um aumento desde Março, com as temperaturas a ultrapassarem os 18 - 20 °C no início de Abril. Este aumento verificou-se até finais de Julho de 2015, quando a temperatura máxima atingiu os 27°C, aproximadamente. A partir deste mês observou-se um decréscimo da temperatura, que em meados de Novembro, foi sempre inferior a 18 °C. Nos meses de inverno, as temperaturas registadas variaram entre 12°C e 15°C, sendo observados em Fevereiro de 2016 os valores mais baixos do período de amostragem (Figura 2.7.). Relativamente às salinidades registadas, variaram entre 3 e 30‰. Os valores inferiores de salinidade foram registados em meados de Janeiro e Fevereiro de 2016 (Figura 2.8.), associados a períodos de precipitação (dados IPMA não representados). Relativamente aos valores mais elevados, não é possível dizer com clareza quando foram registados, pois o sensor apresentou anomalias entre Junho e Agosto.

Foi possível observar o efeito das marés, com flutuações diárias de salinidade que atingiram 22 unidades entre a preia-mar e a baixa-mar. A temperatura também apresentou flutuações diárias de, aproximadamente, 2 °C no Verão e de cerca de 0,5 °C no Inverno (Anexo I). O padrão anual é caracterizado por, em cada grande período de aumento ou diminuição da temperatura, existirem flutuações de pequena escala temporal (um, dois dias). A variação da temperatura da água esteve em estreita relação com as alterações da temperatura atmosférica, conforme registada na estação meteorológica de Alcácer do Sal. A relação e evolução da temperatura na água e na atmosfera pode observar-se na figura 2.7., onde se verifica uma resposta bastante rápida da água à temperatura do ar.



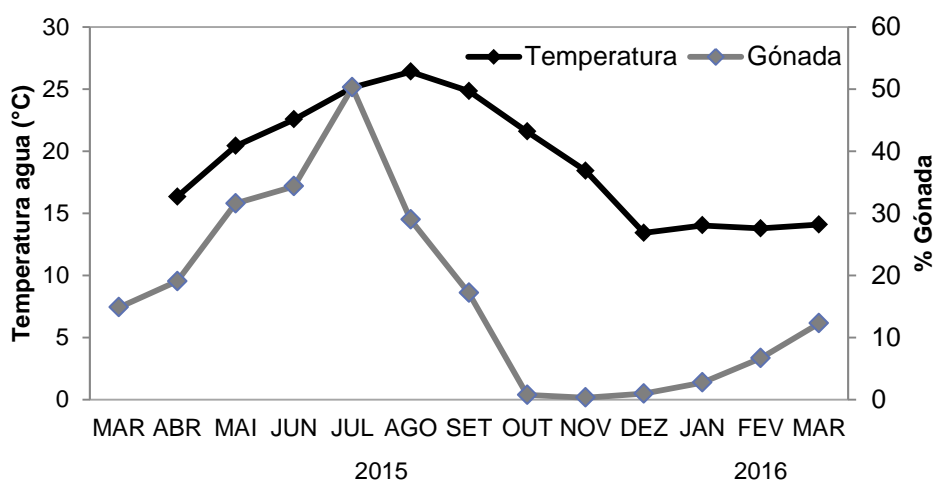
**Figura 2.7.** Evolução da temperatura da água do estuário do Sado (curva a vermelho), registada com o sensor (CTD Star Oddi) fundeado no pilar da ponte ferroviária sobre o Canal de Alcácer, junto ao banco Batalha, e da temperatura do ar (curva a verde) registada na estação meteorológica do IPMA de Alcácer do Sal. As temperaturas do ar registadas são as médias dos últimos 10 minutos de cada hora.



**Figura 2.8.** Evolução da salinidade registada com o sensor (CTD Star Oddi) fundeado no pilar da ponte ferroviária sobre o Canal de Alcácer, junto ao banco Batalha. No período compreendido entre o início de Junho e o início de Agosto de 2015 os dados são de baixa confiança, por o sensor ter apresentado anomalias.

A análise da variação do tamanho da gónada das ostras com a temperatura da água consistiu em estabelecer uma relação com a média dos valores da temperatura da água dos 15 dias antecedentes à recolha das ostras (Figura 2.9).

A percentagem de área ocupada pela gónada aumentou com a temperatura. Os valores da percentagem de gónada ocupada nas ostras, parecem acompanhar os valores da temperatura da água registados (Figura 2.9.). O aumento de temperatura de Março de 2015 e Abril é acompanhado do aumento do número de ostras nos estados III (maduro) e IV (desova), como dito anteriormente os estados de desenvolvimento em que a gónada ocupa mais área em relação aos outros tecidos.



**Figura 2.9.** Variação da percentagem de área ocupada pela gónada e da temperatura ao longo dos meses de estudo. Os valores da temperatura correspondem aos valores médios dos 15 dias antecedentes ao dia de recolha das ostras no banco natural Batalha para estudo do ciclo reprodutivo. Não existem dados da temperatura da água de Março de 2015, visto ter sido o mês de início da experiência.

## 2.4. Discussão

### 2.4.1. Proporção entre sexos e estados de desenvolvimento

O estudo do ciclo reprodutivo da ostra portuguesa, *C. angulata*, e das suas diferentes fases, em bancos naturais ainda é pouco conhecido.

Neste estudo verificou-se que o rácio sexual mudou ao longo do período estudado. No total foram registadas mais fêmeas do que machos, no entanto, os resultados mostram que existe maior proporção de fêmeas nos meses de Março, Abril, Maio e Junho e nos meses correspondentes ao Verão, essa proporção foi revertida observando-se maior proporção de machos como foi registado por Lango-Reynoso *et al.* (1999). Estas observações diferem ligeiramente dos resultados obtidos em alguns estudos com ostras do mesmo género, tendo sido observado populações de ostra portuguesa com uma proporção de 1: 1 (Vilela, 1975). Le Dantec (1968) em França observou maior proporção de machos em populações de ostra portuguesa. Neste estudo, foi observado um número elevado de indivíduos com o sexo indiferenciado, principalmente nos meses correspondentes ao Outono e até meados do Inverno (de Outubro a Fevereiro). Logo após a desova, as ostras passam por um período de reabsorção e reestruturação e até iniciarem novamente a produção das células sexuais, passam por um período de repouso, correspondente neste estudo aos meses aqui referidos.

É importante destacar que nos meses estudados, não foram encontrados indivíduos hermafroditas. Apesar de baixa incidência existem estudos em que se observou uma frequência até 3% de animais com os dois sexos em simultâneo (Vilela, 1975; Steele e Mulcahy, 1999). As diferenças nas razões entre os sexos podem variar não só entre as populações, mas também temporalmente dentro das populações (Lango-Reynoso, 1999; Steele e Mulcahy, 1999). A determinação do sexo nas ostras é um assunto complexo, mas parece ser controlada por fatores genéticos, por fatores ambientais e por factores demográficos (Le Dantec, 1968; Guo *et al.*, 1998). Outros factores que podem estar relacionados com a determinação do sexo são a idade e o tamanho dos indivíduos (Haley, 1977; Buroker, 1983), condições fisiológicas, temperatura, alimento e localização (Lango-Reynoso *et al.*, 1999). A temperatura pode influenciar a determinação do sexo. Num estudo feito com *C. gigas*, em França, o maior número de machos foi obtido em condições de Inverno, ao passo que com temperaturas menos baixas a razão sexual foi balanceada (Fabioux, 2004). Lango-Reynoso (1999) sugere, que os machos predominam em condições "adversas", enquanto o número de fêmeas aumenta quando as condições são favoráveis, nomeadamente com grande quantidade de alimento e temperatura da água elevada. Sugere ainda que a proporção de fêmeas durante o período de maturação sexual é superior e que



no período logo após a emissão dos gametas, a razão sexual é de 1 macho para 3 fêmeas. Neste estudo, o maior número de machos foi encontrado no mês de Agosto, quando a temperatura começou a descer e já muitos indivíduos se encontravam no estado V, em pós-desova, ainda que houvessem indivíduos no estado IV (desova). O mesmo resultado foi obtido no estudo de Lango-Reynoso *et al.*, (1999), onde nos meses em que maioria das ostras parece estar no período de maturação (antes da desova), foram encontradas mais fêmeas e nos meses subsequentes à desova, o número de machos foi ligeiramente superior ao de fêmeas (Julho a Novembro), podendo isto ser explicado pelo decréscimo da temperatura a partir de Agosto. Ambos os sexos parecem estar sincronizados, seguindo ambos, o padrão de desenvolvimento da gónada, o que é particularmente importante para garantir o sucesso reprodutivo da espécie, uma vez que os gametas dos dois sexos, através do sincronismo, serão expelidos para a coluna de água em simultâneo, aumentando a probabilidade de fertilização.

O ciclo reprodutivo nos bivalves é constituído por diferentes etapas: acumulação de reservas, produção de gametas, maturação, desova e período de repouso, havendo uma variação no tempo e duração de cada etapa, tanto dentro como entre espécies. O período de gametogénese é seguido por um evento de desova único, extenso ou por múltiplos eventos que é por sua vez seguido por um período de reconstituição gonadal (Gosling, 2003). Neste estudo, o ciclo reprodutivo mostrou um padrão sazonal definido, com os seis estados gonadais evidentes. No início do estudo, em Março de 2015, a maioria das ostras analisadas já tinham iniciado o processo gametogénico, encontrando-se a gónada nos primeiros estados de desenvolvimento. O pico de animais maduros (estado III) foi registado no mês de Junho e logo no seguinte foi observado o pico de animais em desova (estado IV). Neste mês apenas se observaram ostras nos estados III e IV. A partir de Outubro deixaram de se observar ostras em desova, podendo então dizer-se que o final da época de desova coincidiu com o fim do Verão, início de Outono. Estes dados assemelham-se aos dados obtidos no passado e relatados por Vilela (1975) em relação a *C. angulata* do estuário do Sado, onde naquela altura os bancos naturais eram abundantes. Nessa publicação o autor relata que já encontrava ostras maduras em Fevereiro mas que a maior parte delas nesse estado ocorria no Verão, mais precisamente de Junho a Agosto. Outra observação relatada foi que a partir de Maio alguns indivíduos já tinham iniciado a desova e no Outono a maior parte das ostras já a concluíra. De facto, de um modo geral, a reprodução de várias espécies de bivalves em regiões temperadas passa pelas mesmas fases: a partir do Outono, um período de reabsorção e repouso, marcado pela reorganização do tecido gonadal; no Inverno e Primavera, a fase de multiplicação das células germinativas, ou seja, uma fase de desenvolvimento e crescimento dos gametas; na Primavera-Verão os gametas

maduros são emitidos por sucessivas posturas, de diferentes indivíduos, na água; por fim ocorre uma fase de absorção dos gâmetas não emitidos após as posturas (Gaspar e Monteiro, 1998; Gaspar *et al.*, 1999; Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Chávez-Villalba, 2001; Ren *et al.*, 2003; Fabioux *et al.*, 2005; Matias *et al.*, 2013) .

#### **2.4.2. Área de ocupação da gónada**

Na análise do ciclo reprodutivo das gónadas em bivalves é importante ter em conta dados qualitativos e quantitativos. Os dois métodos recorrem a técnicas histológicas, no entanto, a análise quantitativa, é importante porque elimina a subjetividade e os problemas associados à análise qualitativa (Barber e Blake, 2006). Por outro lado a análise qualitativa é mais rápida, uma vez que não implica medições rigorosas.

Neste estudo a maior percentagem de área ocupada pela gónada ocorreu nos estados III ( $38,6 \pm 11,2$ ) e IV ( $40,4 \pm 14,3$ ), estados definidos anteriormente como estado “maduro” e de “desova”, respectivamente. A menor área de gónada ocorreu quando as ostras se encontravam no início da gametogénese, no estado de desenvolvimento I ( $7,1 \pm 2,6$ ). Estes resultados estão de acordo com o descrito em vários estudos deste género em bivalves, onde o crescimento e desenvolvimento da gónada, parecem estar directamente relacionados com aumento de tamanho dos gâmetas, e.g. no mexilhão (Zwann e Mathieu, 1992), em ostra japonesa (Lango-Reynoso *et al.*, 2000), em amêijoa-boia (Teixeira de Sousa, 2014) e em amêijoa branca (Joaquim *et al.*, 2008). De facto, na análise da parte mediana da massa visceral, a percentagem de superfície ocupada pela gónada está directamente relacionada com o número e/ou tamanho dos gâmetas produzidos (Normand *et al.*, 2009). A área ocupada pela gónada pode ser representativa do esforço reprodutivo, tendo em conta o estudo de Royer *et al.*, (2008) em *C. gigas*. Quando estamos perante uma gonada “imatura”, no início da gametogénese o corpo da ostra é pouco volumoso, a gónada apresenta pouca espessura, ocupando uma pequena superfície do corpo. Os folículos são pequenos e as células sexuais ainda estão pouco diferenciadas, em oogónias e espermatogónias. À medida que os gâmetas se vão diferenciando, sofrendo sucessivas divisões, a gónada vai-se desenvolvendo e o corpo dos indivíduos torna-se mais volumoso como consequência do próprio aumento da gónada. O órgão sexual, assim que se aproxima do estado “maduro” torna-se evidente, revestindo e invadindo todo o corpo da ostra, havendo já gâmetas soltos das paredes dos folículos. Na fase de desova, dependendo se está no início ou já no final, o corpo dos indivíduos e consequente gónada estão mais ou menos volumosos, até passarem à fase de pós-desova onde o volume diminui substancialmente (Vilela, 1975). Estas características explicam também as diferenças

significativas existentes entre os estados de desenvolvimento relativamente à média de área ocupada pela gónada no corpo dos indivíduos. Entre o estado III e IV as diferenças não foram significativas, podendo dar-se a hipótese do facto da maioria dos indivíduos analisados no estado IV (desova) ter iniciado a desova perto da data da amostragem, estando assim esta, ainda volumosa. Num estudo com amêijoia-boia em Portugal, valores semelhantes de áreas gonadais e diâmetros de oócitos entre estados correspondentes a “maturação” e “desova” (neste estudo estado III e IV) significa que a espécie tem um período de desova parcial, onde ocorre produção sucessiva de gâmetas e desova em simultâneo (Teixeira de Sousa, 2014). Também não foram encontradas diferenças significativas entre os estados II e V. Apesar de terem características completamente diferentes, a gónada, nestes dois estados, ocupa áreas no corpo das ostras na mesma ordem de grandeza. No estado II, a gónada, apesar de já estar em actividade avançada e já ter gâmetas diferenciados, alguns até prontos a serem libertados, ainda não se apresenta homogénea, não estando por isso na sua capacidade máxima, com oócitos fixos às paredes dos folículos e espermatídeos não diferenciados em espermatozóides. Da mesma forma, no estado V, há indivíduos que ainda não têm os seus folículos completamente reabsorvidos e por isso ainda ocupam alguma área do organismo. Em muitos é possível encontrar gâmetas do mesmo tamanho dos gâmetas dos estados anteriores, e portanto ocupando espaço dentro dos folículos. Neste estado de pós-desova/reabsorção, apesar dos folículos se apresentarem colapsados e mais pequenos que nos estados antecedentes, ainda apresentam oócitos residuais e espermatócitos densamente nos folículos (Steele e Mulcahy, 1999). Existe alguma heterogeneidade uma vez que alguns indivíduos emitem totalmente os gâmetas e outros podem emitir parcialmente, e em indivíduos que necessitam de reabsorver os gâmetas não libertados, demoram mais tempo a reiniciar o seu ciclo novamente (Chávez-Villalba, 2001) pois necessitam de mais tempo para reorganizar a sua gónada. Neste estudo, os desvios-padrão associados aos valores da superfície ocupada pela gónada aumentam quando os indivíduos estão maduros e em desova. Valores semelhantes foram descritos também noutros estudos com *C. gigas* (Lango-Reynoso, 1999; Fabioux, 2004). Segundo Fabioux (2004) este aumento nos desvios padrão durante a maturação resulta da heterogeneidade da maturação entre os indivíduos. A média da área ocupada pela gónada nas ostras classificadas qualitativamente como estando em desova é a que apresenta um desvio padrão maior e isso pode ser explicado pelo facto de neste estado estarem compreendidos tanto indivíduos em início de desova, como indivíduos a meio do processo, onde grande parte dos gâmetas já foram libertados e os folículos sexuais já estão menos espessos.

### **2.4.3. Ciclo reprodutivo e Parâmetros ambientais (temperatura e salinidade)**

Os dados ambientais (temperatura e salinidade) recolhidos durante o estudo permitiram relacionar a sua influência no desenvolvimento da gónada da ostra portuguesa que cresce naturalmente em bancos do estuário do Sado. O local onde o sensor foi colocado, perto do banco natural em estudo, trata-se de uma zona menos profunda comparando com zonas mais a jusante, como é o caso da baía do estuário, apresentando por isso temperaturas de Verão mais elevadas e as de Inverno mais baixas, ao mesmo tempo recebe menos influência oceânica e consequente amplitudes destes parâmetros maiores. Desde o início do estudo, em Março de 2015, que a temperatura da água foi aumentando até Julho, quando a temperatura máxima foi atingida. A partir deste pico a temperatura foi diminuindo até Fevereiro de 2016 onde foi atingida a temperatura média mínima. A temperatura mínima registada foi de 12°C (Fevereiro) altura em que metade das ostras amostradas se encontravam no estado 0 e a outra metade nos primeiros estados de maturação quando de facto, acontece a diferenciação e proliferação dos gâmetas.

Neste estudo a evolução da área ocupada pela gónada, acompanhou o aumento da temperatura da água registada. Começaram a observar-se indivíduos, ainda que poucos, em desova a partir de Abril, altura em que as temperaturas rondaram os 18-20 °C. O aumento abrupto de animais maduros e em desova e como tal, com uma ocupação de área gonadal maior, deu-se a partir de Maio, coincidindo com o aumento da temperatura, acima dos 20°C. Em Julho cerca de 66,7% dos indivíduos amostrados, encontravam-se em desova, altura em que a média da temperatura dos dias antecedentes a sua amostragem rondaram os 25°C. Os dias antecedentes à amostragem de Agosto, foram os dias com registos mais elevados de temperatura da água do período em estudo. Na amostra recolhida, a maioria dos indivíduos estava em desova e já no estado seguinte de pós-desova. Pode-se dizer que o pico de desova foi despoletado entre os 20 e os 25°C de temperatura média da água. Estes dados estão em concordância com os dados recolhidos no projecto Crassosado, onde se observou a presença de larvas na coluna de água a partir dos 18 - 20°C, correspondentes às temperaturas registadas em Abril e mais abundantes de Maio a Julho onde as temperaturas médias foram superiores a 20°C. Já o assentamento começou a notar-se em Maio e de forma mais intensa entre Junho e Setembro (Anónimo, 2016). De Outubro a Janeiro, a gametogénese cessou, encontrando-se mais de metade dos indivíduos no estado 0, não havendo qualquer actividade gametogénica. Os resultados deste estudo, sugerem que a gametogénese esteve relacionada directamente com a temperatura. Estas observações estão de acordo com vários estudos realizados com ostras

*Crassostrea sp.* (Mann, 1979; Muranaka e Lannan, 1984; Fabioux, 2004; Fabioux *et al.*, 2005; Castaños *et al.*, 2009; Enríquez-Díaz *et al.*, 2009; Aranda *et al.*, 2014). Por exemplo, no estudo de Mann (1979), em *C. gigas*, expostas a temperaturas abaixo de 10,5 °C parece não haver desenvolvimento de gâmetas e abaixo dos 15 °C o desenvolvimento entre sexos é diferente. Muranaka e Lannan (1984) afirmaram que a maturação das células germinais é feita em função da temperatura. O mesmo está descrito em Fabioux (2004) onde se observou artificialmente, que *C. gigas* abranda a maturação em condições de Inverno e a promove em condições semelhantes às de Verão. Em Fabioux *et al.*, (2005) está descrito que a temperatura desempenha um papel fundamental na regulação da mitose das células germinais, sendo que a proliferação da gónada pode dar-se a temperaturas de 8-11°C, prosseguindo a baixa temperatura, uma vez que observaram ostras em estado maduro em temperaturas de Inverno (8°C). Apesar de maduras, a estas temperaturas a desova não ocorre. Por outro lado, nesse mesmo estudo ficou evidente que numa exposição continua a condições de Verão, as ostras desovavam duas vezes num ano. No Chile, por exemplo, *C. gigas* fêmeas não desovam naturalmente em nenhum local onde são produzidas devido a temperaturas baixas, excepto numa ria onde a temperatura da água alcança os 20°C no Verão (Castaños *et al.*, 2009). Fabioux *et al.* (2005) sugere uma possível estratégia a adotar na produção aquícola, no sentido em que as ostras já maduras podem ser mantidas a temperaturas baixas até ser necessário a obtenção de gâmetas. Enríquez-díaz *et al.* (2009) estudou o progresso da gametogénese em *C. gigas* com uma mesma origem, mas colocadas em diferentes ambientes e apesar dos diferentes “timings”, a desova nos dois locais foi relacionada com a temperatura máxima atingida de 19 °C. Temperaturas muito elevadas parecem também, não surtir um efeito positivo no desenvolvimento da gónada. Lubet (1994) descreveu que temperaturas acima de 25°C têm um efeito negativo na proliferação dos gâmetas. Os resultados do presente trabalho e as evidências relatadas para outros locais e/ou ostras parece assim indicar a existência de um intervalo de temperatura óptimo para o desenvolvimento da gónada nestas ostras do estuário do Sado. Se por um lado com temperaturas mais baixas, típicas de Inverno e início de Primavera, pode haver proliferação de gâmetas, assim que as temperaturas aumentam, essa proliferação é acelerada até à maturação e desova, esta também com um intervalo concreto de temperatura, neste caso entre os 20 e os 25 °C. Mann (1979) e mais tarde Fabioux *et al.*, 2005 sugerem que não se trata apenas de um valor absoluto de temperatura que despoleta a maturação das ostras, mas também o período de exposição a essas temperaturas (“dias-graus” acumulados). A maioria dos trabalhos citados referem-se a estudos com *C. gigas*, em regiões onde as temperaturas da água são ligeiramente mais baixas que em Portugal, e raramente chegam às temperaturas alcançadas nos estuários portugueses. A ostra portuguesa analisada neste estudo segue os mesmos padrões, tendo apenas como

flutuação as temperaturas de desova, uma vez os resultados demonstram que os indivíduos de *C. angulata* do Sado desovam a temperaturas ligeiramente mais altas.

Relativamente aos valores registados de salinidade, os meses em que ocorreram os valores mais baixos, correspondem aos períodos em que a maioria dos indivíduos amostrados estava em repouso e não na produção e desenvolvimento de gâmetas, havendo no entanto, alguns indivíduos nos primeiros estados de desenvolvimento. Como já referido a gametogénese pode ser também influenciada pela salinidade. A salinidade do meio é apontada como um fator que, quando é baixo, pode inibir a desova ou mesmo o desenvolvimento pré-desova (Shumway, 1996). Segundo Muranaka e Lannan (1984), salinidades abaixo dos 30‰ têm um efeito negativo na taxa de desenvolvimento gonadal. Estes autores afirmaram que quando a temperatura permanece constante, a salinidade tem influência na gametogénese da mesma forma que a temperatura. No local onde está situado o banco natural estudado, a salinidade apresenta valores frequentemente mais baixos, o que sugere não ser um fator com tanta influência no processo reprodutivo da ostra portuguesa estudada como por exemplo a temperatura. Esta circunstância demonstra a enorme plasticidade da espécie, que enfrenta diariamente grandes flutuações de parâmetros despoletados pelas marés. É necessário mais do que um estímulo para a indução da desova no ambiente natural e acredita-se que a maré, assim como as mudanças na salinidade, induzam o comportamento de desova (His *et al.*, 1999).

É de clara compreensão que não só a temperatura e salinidade têm influência na gametogénese e desova dos bivalves. Outro dos factores apontado como mais importante a seguir à temperatura, é a disponibilidade de alimento e as substâncias de reserva (Muranaka e Lannan, 1984; Ruiz *et al.*, 1992; Chávez-Villalba *et al.*, 2003; Fabioux *et al.*, 2005; Aranda *et al.*, 2014). A qualidade dos gâmetas e os eventos de desova estão relacionados com a disponibilidade de alimento (Fabioux *et al.*, 2005). Por exemplo, num estudo onde *C. gigas* teve duas desovas numa época, a segunda desova teve lugar num período de bloom de fitoplâncton, mesmo com temperaturas mais baixas (Ruiz *et al.*, 1992). A produção dos gâmetas depende da disponibilidade de alimento e a qualidade dos oócitos, está ligada às reservas em stock (Chávez-Villalba *et al.*, 2003). Apesar de não ter sido abordado o tema no âmbito desta dissertação, sabe-se que no período de estudo a concentração de clorofila *a* no estuário do Sado, apresentou valores máximos que rondaram os 20 mg/m<sup>3</sup>, registados na primavera (Abril e início de Junho) e no Verão (Agosto), já os valores mínimos foram observados em Dezembro com valores que rondaram os 0,2 mg/m<sup>3</sup> (Anónimo, 2016). A concentração de clorofila *a*, é geralmente utilizada como “proxy” para a biomassa de fitoplâncton. Parece assim existir neste estudo uma relação não só da temperatura mas também da disponibilidade de fitoplâncton no estuário com o aumento de

ostras em gametogénese activa entre a Primavera e Verão, culminando com o pico de desova nos meses de Verão, e o decréscimo de actividade gametogénica nos meses de Inverno. A maturação das gónadas e a desova na população de ostra portuguesa estudada parece ter estado positivamente correlacionada com a temperatura e a clorofila total como o observado em *C. gigas* noutros estudos (Aranda *et al.*, 2014). Enríquez-Díaz *et al.* (2009) sugere que enquanto a temperatura regula o período e a duração da gametogénese, a quantidade de alimento disponível na coluna de água poderá influenciar a intensidade do processo. A junção de vários factores exógenos desencadeiam os processos internos para a gametogénese. Existem ainda outros condicionalismos que podem também afectar o processo reprodutivo, como a idade dos indivíduos e a poluição ambiental.

A presença de parasitas e o estado sanitário das ostras podem também influenciar o ciclo reprodutivo, sobretudo durante a gametogénese. De facto, a população estudada, está sujeita aos efeitos de diversos agentes patogénicos. Neste estudo foram identificados os efeitos da ação de agentes de diversa natureza. Alguns xenobióticos presentes no meio, como por exemplo metais pesados, identificados no âmbito do projecto onde este trabalho se enquadra, estão associados à presença de lesões de metaplasia do epitélio dos divertículos da glândula digestiva. Alterações das condições ambientais, como por exemplo a diminuição brusca da salinidade que se verifica nos meses de inverno durante as fortes escorrências do rio, sobretudo na zona do canal onde se localiza a população estudada, são responsáveis pela perturbação da ação osmorreguladora dos animais, dando origem à formação de edema no manto e tecido conjuntivo intersticial. Agentes parasitários como a polidora, um poliqueta que é responsável pela ampolagem da concha, a lesão macroscópica mais relevante observada na população estudada. É pois relevante a ação que os agentes patogénicos, de diversa natureza, exercem no estado higiossanitário destes animais, sobretudo no efeito que a reparação das lesões por eles provocadas tem no balanço energético do indivíduo. No entanto os parasitas e as lesões encontrados na ostra portuguesa analisados neste trabalho, são de baixa patogenicidade e, aparentemente, a população estudada encontra-se bem adaptada, recuperando com relativa facilidade das lesões provocadas pelos agentes patogénicos logo que as ostras são transpostas para ambientes menos hostis, como se verifica nos viveiros localizados mais a jusante no estuário. Por outro lado sabe-se que a capacidade gametogénica destas espécies é fundamental para sua estratégia de sobrevivência. A imensa quantidade de gâmetas produzidos por um único indivíduo, fruto da intensa mobilização das suas reservas energéticas que se traduz numa perda de cerca de 60% do peso das suas partes moles após cada desova, permite uma variabilidade genética extremamente elevada, gerando indivíduos capacitados para resistir às ameaças que estas populações enfrentam. Assim, considera-se que a população analisada neste trabalho evidenciou um estado sanitário

idêntico ao observado noutras zonas do estuário próximas do banco natural estudado, podendo afirmar-se que o seu estado não teve influência no desempenho gametogénico do ciclo reprodutivo dessa população.



## **CAPÍTULO 3.**

# **PATOLOGIAS - ESTADO SANITÁRIO**

---

### 3. Patologias - Estado sanitário

#### 3.1. Enquadramento

A importância económica dos bivalves pode ser avaliada pela quantidade de estudos desenvolvidos sobre as patologias que os afectam. As doenças podem ter um grande impacto no sucesso do sector da moluscicultura. A produção de bivalves é uma actividade altamente desenvolvida em muitos países, e durante o seu desenvolvimento, muitos desses países têm sido confrontados com várias doenças de severidade e duração variadas, que por vezes resultam em mortalidades em massa (Renault, 1996).

As doenças resultam da interacção entre três fatores: hospedeiro, agente patogénico e ambiente. Os principais agentes patogénicos dos bivalves marinhos são: vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintas e crustáceos parasitas (Gosling, 2003). Alguns organismos podem estar presentes no hospedeiro por longos períodos sem causarem danos, mas se o balanço entre os três factores for perturbado, podem tornar-se agentes patogénicos, como alguns vírus e bactérias. Outros apenas causam danos se presentes em elevadas cargas, como os ciliados. Os episódios de mortalidade tanto ocorrem em meio natural como em zonas de cultivo, no entanto com o incremento da produção em aquacultura, a possibilidade de ocorrência e de dispersão de doenças cresce significativamente (Batista, 2007). As transferências não controladas e a introdução de espécies exóticas de bivalves para aquacultura, aumentam bastante o risco de introdução de novos agentes patogénicos (Bower *et al.*, 1994).

Os episódios de mortalidade estão principalmente associados a agentes patogénicos, no entanto, há casos em que más condições ambientais (contaminações e poluição) ou más práticas podem ser os responsáveis (Bower *et al.*, 1994; Renault, 1996). Sabe-se que os contaminantes podem ter influência nas funções imunológicas dos bivalves, aumentando a sua susceptibilidade a organismos patogénicos (Pipe e Coles, 1995). No caso das doenças infecciosas, a introdução frequente de animais de outras áreas geográficas, resultou na introdução de organismos que causaram a mortalidade em massa entre os stocks nativos (Renault, 1996).

Existe um número limitado de trabalhos sobre as patologias e agentes que afectam a ostra portuguesa. A maioria das publicações existentes diz respeito à investigação das causas dos episódios de mortalidade ocorridos em França de 1967 a 1973 (Comps, 1988). O facto de *C. gigas* ser a espécie de ostra mais produzida em toda a Europa, faz com que seja alvo de estudos mais frequentes.

As publicações disponíveis sobre as principais patologias que afetam as populações de ostra do estuário do Sado são das décadas de 1970 e 1990, do século passado, e é por isso natural que possam não reflectir a situação atual (Vilela, 1975; Ruano e Dias, 1994). Para a zona do Algarve (Ria Formosa) existe um trabalho mais recente Batista (2007) que descreveu alguns agentes patogénicos e doenças em *C. angulata* produzidas em maternidade e que foram posteriormente colocadas na Ria.

A monitorização regular das patologias nas diversas populações é relevante já que a avaliação do quadro nosológico de uma população parte de um conhecimento base sobre o seu histórico. O laboratório de patologia do IPMA tem assegurado essa monitorização em Portugal, efectuando uma avaliação com base no estudo do quadro lesional das populações e dos principais agentes patogénicos presentes.

As lesões e agentes mais comuns de serem observados em ostras do género *Crassostrea* sp. são descritos de seguida.

#### **Quadro lesional:**

Degenerescência ceróide ou Ceroidosis - alteração celular que se apresenta de coloração acastanhada, depositada sobretudo no tecido conjuntivo vacuolar. Trata-se de um processo degenerativo, caracterizado pela formação de “células” pigmentadas, constituídas por material não-degradável, resultando maioritariamente da acumulação de proteínas e lípidos oxidados (Yin, 1996);

Edema – normalmente chamado “edema de água doce” por estar ligado a acumulação de água doce nos tecidos do animal. Trata-se da expansão dos espaços intersticiais em diversos tecidos, devido à presença de exsudado, fruto de uma disfunção osmoregulatória, provocada por excesso de água doce, normalmente devido a exposição a períodos de precipitação prolongados (Ruano, 1997);

Necrose celular – autólise da estrutura citoplásmica e nuclear das células. Perda de tecido, perda de cílios nos filamentos branquiais, etc;

Hemocitosis ou infiltração hemocitária - é um processo inflamatório, reflexo da reacção defensiva do hospedeiro a diferentes agentes agressores;

Metaplasia – lesão orgânica caracterizada por perturbações no crescimento (redução) ou na morfologia de um órgão ou de uma estrutura específica desse órgão. Em relação às ostras, o mais observado é o adelgaçamento das paredes dos ductos ou túbulos da glândula digestiva. Casos de metaplasia podem estar relacionados com a presença de contaminantes, como os pesticidas (Meyers e Hendricks, 1982), ou de parasitas, como *Mytilicola orientalis* (Sparks, 1962).

## Principais patogéneos:

### Vírus:

Doença das brânquias – Associada à presença de um Iridovirus, um agente altamente patogénico que segundo vários autores, foi responsável pelas mortalidades massivas ocorridas em França e resto da Europa nas décadas de 1960 e 1970 (Ruano e Dias, 1994; Renault, 1996; Ruano, 2008). *C. angulata* é tida como o hospedeiro mais comum por se pensar estar na origem da sua decadência nas décadas mencionadas anteriormente, podendo no entanto afectar outras ostras (Comps, 1988). A ação deste agente pode causar lesões devastadoras no tecido branquial e palpos labiais. A análise macroscópica revela a descoloração amarelada do órgão, junto das lesões degenerativas e necróticas. Dependendo da evolução, o agente, provoca perfurações ou a erosão de várias zonas das lamelas branquiais. As lesões histopatológicas caracterizam-se pela presença de zonas necróticas extensas e granulomas nos epitélios branquial, dos palpos labiais e do manto acompanhados por uma forte infiltração hemocitária. (Ruano e Dias, 1994; Comps, 1988; Ruano, 2008).

Doença estival da ostra ou “Summer mortality” – é uma síndrome caracterizada por elevadas taxas de mortalidade em juvenis e adultos de *C. gigas* durante a sua fase de maior crescimento, normalmente na época estival, que afetam a sua produção comercial em toda a Europa e também em Portugal (Ruano, 2008). Há muitas hipóteses que explicam esta mortalidade, e.g. condições ambientais como elevadas temperaturas e salinidade, stress fisiológico provocado pela reprodução e patologias. Há estudos que têm associado a doença estival da ostra a vários agentes patogénicos, como por exemplo o vírus do tipo Herpes, OsHV-1 (Friedman *et al.*, 2005) e as bactérias *Nocardia* sp. (Friedman *et al.*, 1991) e *Vibrio splendidus* (Lacoste *et al.*, 2001).

*Ostreid herpesvirus* - dos vários agentes patogénicos que podem provocar elevadas taxas de mortalidade em bivalves, destaca-se a infecção por um vírus tipo-herpes, *Ostreid herpesvirus 1* e por esta razão, é dos agentes mais estudados. Foi o primeiro herpesvirus a ser identificado num hospedeiro invertebrado, e está associado a episódios de mortalidades massivas em *C. gigas* (Arzul *et al.*, 2001a; Arzul *et al.*, 2001b). Este vírus pode afectar larvas e juvenis de diferentes espécies, e.g. *C. gigas*, *C. angulata*, *C. rivularis*, *O. edulis*, *R. decussatus*, *R. phillipinarum* e *P. maximus* (Renault e Novoa, 2004). A deteção de infecções por OsHV-1 tem sido regularmente associada a elevadas taxas de mortalidade em *C. gigas*, principalmente em larvas e juvenis, em diferentes países (Hine *et al.*, 1992; Nicolas *et al.*, 1992; Renault and Novoa, 2004). Embora os episódios de mortalidade sejam

maioritariamente descritos em larvas e juvenis, este vírus, também tem sido reportado em adultos de ostra, mas não associado a eventos de mortalidades anormais (Arzul *et al.*, 2002). Desde 2008, uma nova variante do vírus, OsHV-1 *μvar*, tem sido identificada e associada a elevadas taxas de mortalidade, por vezes de 100%, em *C. gigas* na Europa (Segarra *et al.*, 2010). Estudos sobre a presença do vírus em *C. angulata* são menos frequentes. Na Europa, as mortalidades em massa em populações de ostra portuguesa, no passado (1960-1970) foram associadas a um iridovírus (Comps, 1988). Elevadas mortalidades causadas pelo vírus OsHV-1, foram mais recentemente observadas. Em *C. angulata*, observou-se a transmissão do vírus por meio experimental (Arzul *et al.*, 2001a) e foram também registados episódios de mortalidade em adultos de ostra portuguesa colocados na Ria Formosa (Batista *et al.*, 2015). A variante OsHV-1 *μvar* foi detectada pela primeira vez em *C. angulata* (Batista *et al.*, 2015). Este vírus pode causar elevados prejuízos na produção em toda a Europa e também em Portugal, bem como nos bancos naturais de ostra portuguesa.

#### **“Bacteria”**

Rickettsia e células-tipo rickettsia- ocupam um espaço na taxonomia entre as bactérias e os vírus. Apresentam-se de dimensões pequenas e de formas variáveis (Azevedo and Villalba, 1991). Formam colónias nas células epiteliais das brânquias e glândula digestiva. As infecções são normalmente de uma intensidade reduzida e não parecem estar associadas a alguma patologia (Bower *et al.*, 1994), no entanto em casos de intensidade elevada, poderão ter consequências para o organismo, na medida em que as funções do órgão afetado podem ficar comprometidas (Renault e Cochenne, 1994).

#### **Fungos:**

“Doença do pé” - provocada pelo fungo *Ostracomblabe implexa*. Esta doença, também conhecida como doença da concha nas ostras, afeta principalmente a zona de inserção do músculo adutor. A doença desenvolve-se na concha, penetrando a sua parte interna. O agente forma inicialmente, pequenos nódulos esbranquiçados e salientes com o centro mais claro, que se juntam formando verrugas de conchiolina na face interna da concha, causando o seu espessamento. Dependendo da evolução da doença, podem-se associar bactérias às lesões, provocando a necrose do tecido muscular, levando progressivamente à perda de funcionalidade do músculo. O movimento das valvas pode ficar comprometido e consecutivamente levar à morte do animal (Bower *et al.*, 1994; Ruano e Dias, 1994; Ruano, 2008).

#### **Protozoários:**

Ciliados: parasitam normalmente órgãos mais externos, como as brânquias, palpos labiais e manto, tendo normalmente uma ligação superficial com os tecidos. Dentro do grupo de ciliados, os géneros *Ansistrum sp.*, *Ancistrocoma sp.* e *Trichodina sp.* são os mais registados em ostras. Exceptuando os *Ancistrocoma sp.* que vivem no lúmen dos túbulos da glândula digestiva da ostra, alimentando-se das células epiteliais, a presença de indivíduos dos outros géneros no interior dos ductos e túbulos da glândula digestiva é sinal de fragilidade e stress geral do hospedeiro, pois não está a conseguir travar a sua migração para as zonas mais resguardadas do organismo (Ruano e Dias, 1994; Ruano, 2008). A maior parte das infestações são inócuas, quando o número de parasitas é baixo. Em casos de infestações intensas, a acção erosiva provocada pelos parasitas leva à debilidade do hospedeiro, perda de tecido e consequente morte (Comps, 1988; Ruano, 2008).

### **Metazoários**

Helminthas - Turbellaria - várias espécies existentes, e.g. *Urastoma cyprinus*. Este agente é conhecido como “Oyster gill-worm”, é oportunista e localiza-se no manto e tecido branquial dos bivalves (Bower *et al.*, 1994).

Copepoda:

*Mytilicola sp.* - parasitam o intestino e o estômago da ostra. No hospedeiro, principalmente em casos de maior carga do parasita, observam-se lesões graves nos tecidos, com necrose, perdas tissulares e metaplasia. O parasita não está directamente ligado a casos de mortalidade, mas tal pode acontecer, quando a ele se associam factores externos adversos (Ruano, 2008).

Decapoda:

*Pinnotheres sp.* - Crustáceo que vive toda a sua vida, após as fases larvares, na cavidade intravalvar de várias espécies de bivalves. A sua relação ecológica com os bivalves trata-se mais de comensalismo do que parasitismo. Por vezes, observam-se lesões macroscópicas nas lamelas branquiais, fruto da acção erosiva deste agente (Ruano, 2008).

Anelídeos:

*Polydora sp.* – poliquetas responsáveis pela formação de ampolas de lodo na face interna da concha. Este agente constrói galerias onde se vai acumulando sedimento (e.g. vasa), que são depois cobertas por constituintes da concha, originando as ampolas de dimensões variáveis. O agente é responsável pela deformação da concha, dando um aspecto e cheiro desagradável para comercialização. A presença deste agente é um problema grave em ostreicultura, uma vez que o valor comercial dos espécimes, diminui significativamente. Para além da construção das ampolas, pode provocar também lesões no manto e músculo

adutor. Há relatos de episódios de mortalidade associados à sua presença em bancos naturais (Ruano e Dias, 1994; Ruano, 2008).

A utilização de técnicas de diagnóstico adequadas é essencial para determinar a causa das doenças bem como o modo de acção dos agentes patogénicos. A prática mais comum em investigação e detecção de rotina de agentes patogénicos e despiste de doenças é feita através de exames histológicos e observação microscópica. O uso de técnicas histológicas no estudo de patologias em moluscos bivalves é essencial pois é a única técnica que permite uma avaliação geral do estado dos indivíduos, juntamente com informação mais detalhada como alterações morfológicas e celulares, presença de organismos estranhos, determinação do nível de infecção, entre outros (Couñago, 2016). Outras técnicas muito utilizadas e que têm vindo a desenvolver-se cada vez mais na área da patologia de bivalves, são técnicas de biologia molecular (e.g. “Reacção em Cadeia da Polimerase” - PCR) que permitem um diagnóstico mais rápido e sensível.

A avaliação do estado geral das ostras, das suas doenças e parasitas, são um factor indicativo da qualidade comercial dos animais, mas também da sua salubridade. Por essa razão, também a análise dos caracteres organolépticos desempenha um papel fundamental na avaliação da qualidade dos bivalves e, em particular, das ostras colocadas no circuito comercial (Cachola e Ruano, 2000).

O conhecimento do quadro nosológico das populações de ostra portuguesa é um instrumento de grande importância, não só para a avaliação do risco, no caso da sua produção comercial, mas também para a gestão sustentável dos bancos naturais, tendo em vista eventuais medidas de controlo ou de prevenção de agentes patogénicos. É importante, por isso, ter acesso à identificação atualizada, dos principais agentes patogénicos da ostra portuguesa no estuário do Sado. Comparativamente aos bancos mais próximos da baía do estuário, as zonas com bancos naturais de *C. angulata* mais a montante, no canal de Alcácer, como referido no sub-capítulo 1.2.1, foram sempre consideradas como as de menor qualidade, mesmo tendo sido as zonas onde o recrutamento da espécie se manteve ao longo dos anos. Esta zona do canal de Alcácer, além de ter características ambientais muito próximas dos limites de colonização da espécie, corresponde também a uma área “crítica” do estuário, já que faz parte da zona de transição entre a parte dulçaquícola e o meio marinho. Apresenta, por isso, condições que induzem um forte *stress* fisiológico aos animais. Também por esta razão neste trabalho o banco seleccionado, é um dos mais recentes assentamentos localizados nesta zona.

A transposição dos animais dos bancos mais a montante para zonas do estuário mais próximas da Baía Central, onde a água de características mais oceânicas tem um período

de permanência mais longo, e portanto uma influência marcante sobre os animais, pode contribuir para uma melhoria significativa da sua condição fisiológica. Esta diminuição da pressão ambiental sobre a fisiologia dos animais pode fazer com que os fatores organolépticos dos animais melhorem significativamente, e contribuir para a sua valorização comercial. Neste trabalho será também abordado o estudo comparativo entre uma população selvagem de ostras, o banco natural da Batalha, e ostras colocadas num viveiro, com maior influência da baía central do estuário.

O termo “patologias” referido no título e capítulo desta dissertação refere-se não ao estudo das doenças em si (causas, tratamento, etc), mas a um desvio em relação ao que é considerado normal, ou seja, refere-se de uma forma elementar ao conjunto de alterações e/ ou lesões provocadas por diferentes agentes patogénicos analisados neste trabalho, sobretudo os de origem parasitária e os de origem ambiental, com impacto no estado sanitário dos animais.

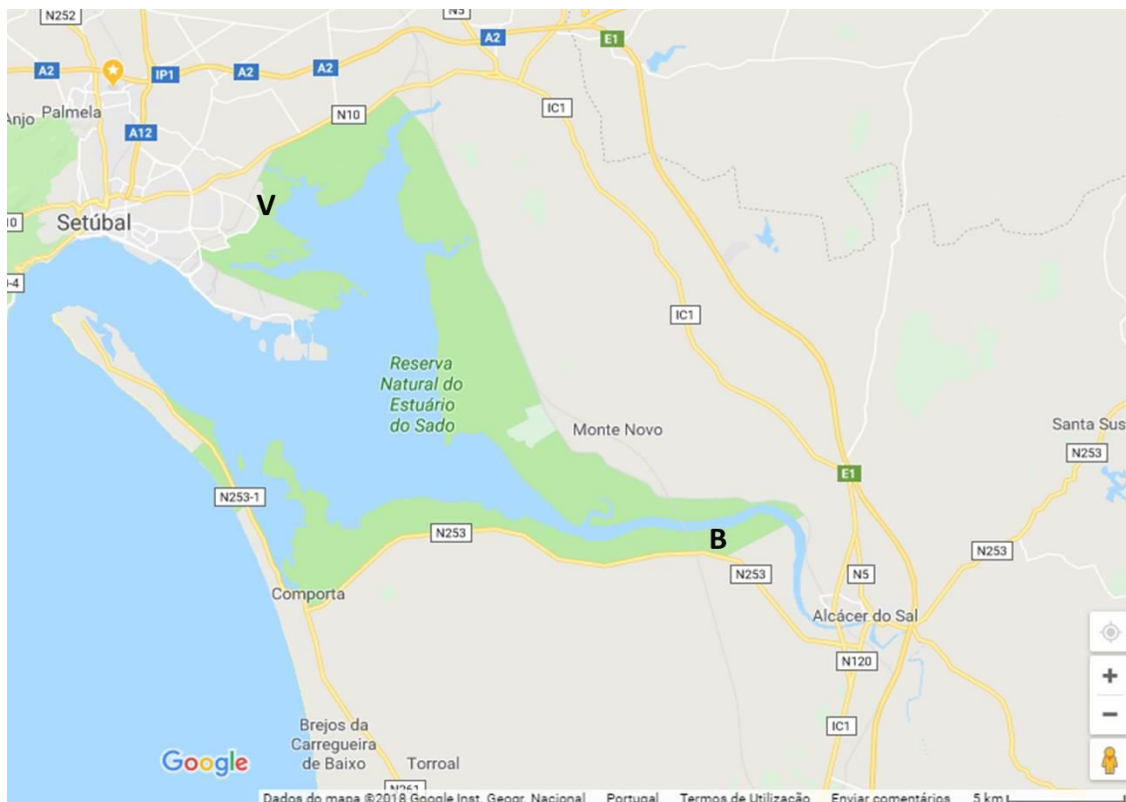
Os objetivos da parte do trabalho descrita neste capítulo passam por identificar lesões e agentes patogénicos em ostra portuguesa no estado adulto, de um banco natural e de um viveiro através de observação macro e microscópica, contribuindo assim para a atualização dos agentes existentes no estuário do Sado. Para além da identificação dos agentes e lesões nos dois locais, pretende-se comparar os dois locais quanto à sua situação sanitária. O desenvolvimento de um índice para avaliação e quantificação das lesões, alterações morfológicas e parasitas em ostras, de forma a ser aplicado em trabalhos de rotina tornando a avaliação do estado sanitário menos subjetiva é também um objetivo importante neste capítulo.

## **3.2. Metodologia**

### **3.2.1. Amostragem**

Para o estudo das principais doenças e parasitas que afectam as ostras no estuário do Sado foram realizadas amostragens, com uma periodicidade sazonal, no banco escolhido, denominado por Batalha e no viveiro Anjos, localizado no canal da Vaia (Figura 3.1.). Para a comparação entre populações selvagens e de viveiro as amostras de viveiro foram obtidas no banco natural Batalha e colocadas no viveiro para serem amostradas sazonalmente. No viveiro as ostras foram colocadas em mesas. Cada amostra foi constituída por 30 indivíduos. As amostras correspondentes ao banco natural foram as mesmas utilizadas para o trabalho descrito no capítulo 2. (Ciclo reprodutivo).





**Figura 3.1.** Localização dos dois locais de amostragem no estuário do Sado, B- banco natural Batalha e V- Viveiro “Anjos” (Google, 2018).

### 3.2.2. Trabalho laboratorial

Com base no padrão de incidência dos potenciais agentes patogénicos já conhecidos pelo laboratório de patologia do IPMA, foi levado a cabo o rastreio das doenças e parasitas com maior incidência nas ostras do Sado. Para tal, foram seguidos os protocolos rotineiramente usados pela equipa para os exames anatomopatológicos e histopatológicos, adaptados de Howard e Smith (1983).

#### 3.2.2.1. Observações macroscópicas

Em laboratório, as ostras foram lavadas e medidas (altura = dimensão máxima) individualmente. Em seguida, foram sujeitas ao exame anatomopatológico que consiste na sua avaliação macroscópica, identificando e registando a coloração geral dos indivíduos, possíveis lesões (e.g. lesões da doença do pé; lesões branquiais), alterações observadas na concha (e.g. ampolas de lodo ou ampolagem gelatinosa na sua face interna) e nas partes moles (e.g. presença de metazoários ectoparasitas; presença de edema). Relativamente à coloração dos indivíduos, considera-se uma cor normal a cor creme ao contrário de uma

coloração em tons de verde ou translúcida (“aquosa”) que revela algo menos positivo para as ostras deste estuário. Neste exame macroscópico, avaliou-se também o estado de carnes, feito com base num critério simples que consiste em avaliar a percentagem de preenchimento da hemivalva esquerda (côncava) pelas partes moles do corpo do indivíduo e atribuir-lhe uma classificação subjetiva com cinco níveis (Magro, Magro +, Magro ++, Gordo e Gordo +), sendo o nível máximo atribuído quando a carne ultrapassa o limite da concha esquerda (côncava).

Após este exame macroscópico, fica-se com uma ideia geral da condição de cada indivíduo e prepararam-se as amostras para o exame histopatológico.

### **3.2.2.2. Histopatologia**

Para a histopatologia, procedeu-se à preparação de cortes histológicos a partir dos mesmos exemplares recolhidos para o estudo do ciclo reprodutivo. As amostras recolhidas no viveiro, seguiram também o mesmo processo histológico já descrito no subcapítulo 2.2.2.

As preparações histológicas foram observadas ao microscópio óptico. As alterações, lesões e parasitas encontrados, foram identificados e registados.

Para avaliar o estado sanitário das ostras ao longo das épocas de amostragem, criou-se uma escala de avaliação da intensidade de agentes patogénicos e lesões encontrados em cortes histológicos de *C. angulata*. Com a elaboração desta escala de três níveis (tabela 3.1.), pretende-se a simplificação da leitura dos resultados obtidos e uniformização de futuros trabalhos. A elaboração desta escala permitirá obter alguma objetividade na avaliação e quantificação microscópica das lesões, alterações morfológicas e parasitas observados. Na escala criada, consideram-se agentes patogénicos os parasitas encontrados e que são facilmente contabilizados, e.g., ciliados, esporozoários, colónias de rickettsia, metazoários, copépodes, etc. A avaliação das lesões e alterações morfológicas nos vários tecidos e órgãos, refere-se a alterações como necroses, metaplasia, ceroidose, hemocitose, edema e outros.

**Tabela 3.1.** Escala de avaliação de intensidade de agentes patogénicos e lesões e/ou alterações morfológicas em cortes histológicos de *C. angulata*. Nota: o resultado tem em conta a avaliação de todo o corte histológico de cada espécimen.

	<b>Agentes patogénicos</b>	<b>Lesões/ alterações morfológicas</b>
<b>0</b>	Sem evidência de qualquer parasita.	Sem evidência de lesões ou quaisquer alterações morfológicas.
<b>1</b>	Presença de pelo menos 1 parasita até ao máximo de 10.	Observação de lesões ou alterações morfológicas numa porção reduzida de algum órgão ou tecido. Menos de metade do órgão ou tecido afectado.
<b>2</b>	Observação de um número de parasitas superior a 10.	Observação de lesões ou alterações morfológicas na quase totalidade do órgão ou tecido. Mais de metade do órgão ou tecido afectado.

À parte da escala de intensidade foi criada uma outra escala de gravidade do parasita ou lesão/alteração morfológica para o hospedeiro (tabela 3.2.). Esta escala foi criada tendo em conta a importância que cada parasita ou lesão/alteração morfológica tem nas ostras, ou seja, se afecta mais ou menos o indivíduo. A cada variável (doença/lesão) encontrada foi atribuído um número de 1 a 3, em que 1 significa ser menos grave para o hospedeiro e 3 o mais grave, afetando mais o hospedeiro.

**Tabela 3.2.** Escala de avaliação de gravidade de agentes patogénicos e lesões/alterações morfológicas em cortes histológicos de *C. angulata*, 1=razoável; 2= grave; 3= muito grave.

<b>Parasita/Lesão/Alteração morfológica</b>	<b>Escala de gravidade (1,2,3)</b>
Ceroidose	1
Hemocitose nas branquias	3
Hemocitose no tecido conjuntivo	3
Hemocitose no manto	2
Hemocitose na glandula digestiva	2
Metaplasia	2
Necrose nas branquias	3
Necrose no tecido conjuntivo	3
Necrose no manto	3
Necrose na glandula digestiva	3
Edema nas branquias	2
Edema no manto/t. conjuntivo	2
Rickettsia	1
Esporozoa	2
Ciliados nas brânquias e manto	1
Ciliados na glândula digestiva	2
Copépodes	1

O valor encontrado pela aplicação das duas escalas é depois multiplicado para cada doença, lesão ou parasita. No final, é efectuado o somatório do valor para cada indivíduo, resultando um índice do estado sanitário de cada ostra- IAESO.

A partir do resultado final do índice para cada indivíduo, foram calculados os percentis 25, 50, 75 e 95 para se poder atribuir uma classificação final do estado de cada ostra. Considera-se uma ostra em estado crítico, quando o resultado do índice está acima de 16. Entre 12 e 16, considera-se estado muito grave. Entre 6 e 12, considera-se estado grave. Valores de índice entre 4 e 6 considera-se estado razoável e abaixo de 4 consideram-se saudáveis (Tabela 3.3.).

**Tabela 3.3.** Classificação do estado das ostras segundo o índice de avaliação do estado sanitário das ostras (IAESO).

Valor do índice	Estado
$4 \geq \text{IAESO}$	Saudável
$4 < \text{IAESO} \leq 6$	Razoável
$6 < \text{IAESO} \leq 12$	Grave
$12 < \text{IAESO} \leq 16$	Muito grave
$\text{IAESO} > 16$	Crítico

O índice de avaliação do estado sanitário das ostras (IAESO), foi criado neste estudo, com o intuito de uniformizar a avaliação do estado sanitário das ostras estudadas, ajudando a descrever de uma melhor forma o estado das ostras e para melhorar o que já se fazia no laboratório. É uma métrica com maior objetividade para trabalhar e que poderá ser aplicada rotineiramente nos trabalhos do laboratório de patologia do IPMA.

Exemplo do cálculo do índice para uma ostra cuja aplicação da escala de intensidade para cada tipo de parasita ou lesão/alteração morfológica está demonstrada na tabela 3.4.,

**Tabela 3.4.** Exemplo de aplicação escala da avaliação de intensidade de agentes patogénicos e lesões e/ou alterações morfológicas em cortes histológicos a um espécime de *C. angulata*. Ceroidose (Cero.); Hemocitose nas brânquias (H.Br); Hemocitose no tecido conjuntivo (H.Tc); Hemocitose no manto (H.Mt); Hemocitose na glândula digestiva (H.Gd); Metalasia na glândula digestiva (Met.); Necrose nas brânquias (N.Br); Necrose no tecido conjuntivo (N.Tc); Necrose no manto (N.Mt); Necrose na glândula digestiva (N.Gd); Edema no tecido conjuntivo (E.Tc); Edema no manto (E.Mt); Rickétsias (Ric.); Esporozoários (Esp.); Ciliados nas brânquias e manto (Ci.BrMt); Ciliados da glândula digestiva (Ci.Gd); Copépodes (Cop.).

Cero	H.Br	H. Tc	H.Mt	H.Gd	Met.	N.Br	N.Tc	N.Mt	N.Gd	E. Tc	E. Mt	Ric.	Esp.	Ci.BrMt	Ci.Gd	Cop.
1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Cálculo final do índice com a aplicação das duas escalas (de gravidade e de intensidade) segundo o exemplo da tabela anterior:

$$1 \times 1 + 3 \times 0 + 3 \times 2 + 2 \times 0 + 2 \times 0 + 2 \times 0 + 3 \times 0 + 3 \times 0 + 3 \times 0 + 3 \times 0 + 2 \times 0 + 2 \times 0 + 1 \times 0 + 2 \times 0 + 1 \times 0 + 2 \times 1 + 1 \times 0$$

Resultado=9, estado grave

### 3.2.3. Análise dos dados

Para comparar aspectos macroscópicos como a cor dos indivíduos e ampolagem entre o banco e o viveiro utilizou-se o teste – G de independência com o auxílio do software Rstudio V 0.99.842 (RStudio, Inc.). Esta análise serviu para comparar se a proporção de indivíduos do banco com um determinado parasita ou lesão, ou aspeto é diferente para a proporção de indivíduos com esse parasita ou lesão, ou aspeto do viveiro, ao longo dos meses de amostragem. O nível de significância considerado para todas as análises foi de 0,05.

Para analisar individualmente cada doença / parasita registados no exame macroscópico, foi feita uma análise de variância a dois factores (ANOVA) quando os pressupostos do teste são cumpridos, para os casos em que os pressupostos para a ANOVA não estavam reunidos foram efetuados testes não paramétricos (Kruskal-Wallis). Os testes de variância foram realizados com o auxílio do software Systat Software, Inc. SigmaPlot for Windows, versão 12.5.

Para comparação das doenças ou alterações morfológicas analisadas microscopicamente, entre os dois locais de estudo ao longo dos diferentes meses de amostragem elaborou-se uma PERMANOVA (Anderson *et al.*, 2008) a dois factores: “local” com 2 níveis e “época” com 4 níveis, através da elaboração de uma matriz de similaridade de Bray Curtis. Nas comparações efetuadas com recurso a PERMANOVA foi aplicado o teste geral, onde os dados brutos são permutados para se obter o valor da probabilidade, sendo no máximo

efetuadas 999 permutações. O nível de significância considerado para todas as análises foi de 0,05. Após esta análise, testou-se a contribuição de cada parasita, lesão ou alteração morfológica para o resultado da PERMANOVA, através de uma análise SIMPER – “Similarity Percentages - species contributions”.

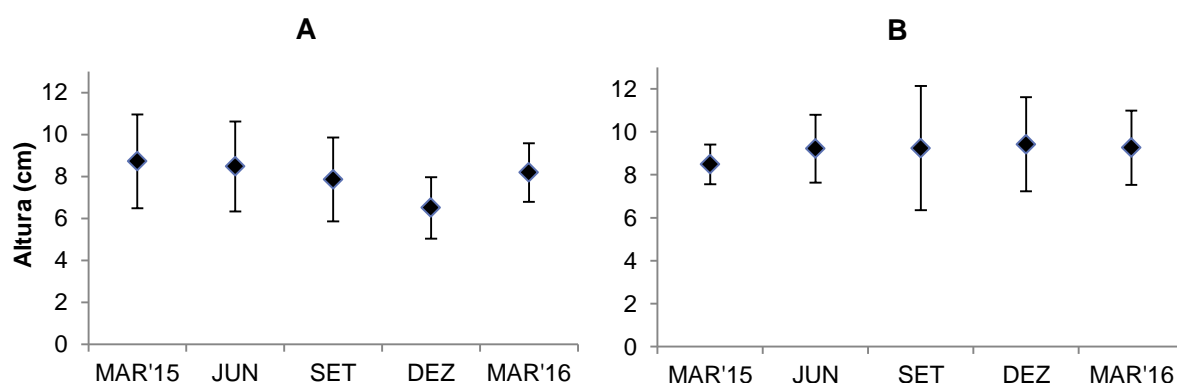
Nas análises de comparação de aspetos e parasitas/lesões observadas tanto macroscopicamente como microscopicamente, os dados relativos às ostras recolhidas em Março de 2015 no banco, foram retirados por corresponderem ao início da experiência (quando as ostras do viveiro foram amostradas no banco natural).

Para comparação dos dois locais de estudo e dos meses de amostragem em relação aos valores do índice de avaliação dos estados sanitário das ostras, fez-se uma análise de variância a dois factores (ANOVA).

Para validação do índice desenvolvido, utilizaram-se métricas externas de qualidade das ostras como o estado de carnes e o estado de maturação dos indivíduos (capítulo 2) como variáveis independentes numa regressão linear múltipla. Estas métricas funcionam também como medidas de onde se pode aferir o estado de qualidade dos indivíduos.

### 3.3. Resultados

Foram analisadas um total de 149 ostras do banco natural e 116 ostras do viveiro. A média de alturas dos indivíduos do banco e viveiro foram  $7,96 \text{ cm} \pm 2,01$  e  $9,14 \text{ cm} \pm 1,97$  respectivamente (Figura 3.2.).

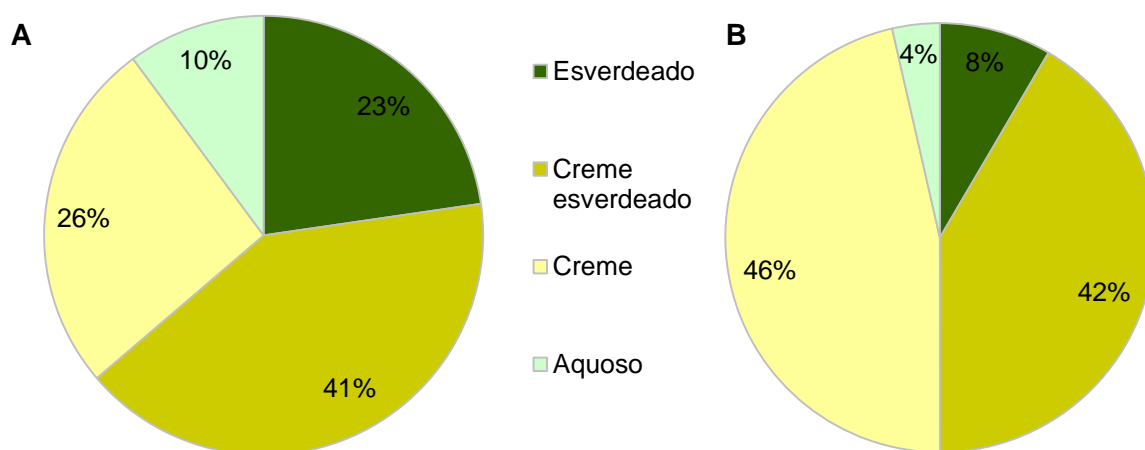


**Figura 3.2.** Altura média das ostras recolhidas ao longo dos meses de amostragem no banco (A) e no viveiro (B) (MAR'15- Março de 2015; JUN- Junho; SET- Setembro; DEZ- Dezembro; MAR'16- Março de 2016).

### 3.3.1. Observações macroscópicas

Para comparação de aspetos e parasitas observados macroscopicamente no banco selvagem e no viveiro foram utilizados os dados de 4 meses de amostragem, Junho, Setembro, Dezembro de 2015 e Março de 2016, relacionados com as 4 estações do ano.

Relativamente à coloração geral das partes moles das ostras, observou-se no total dos indivíduos recolhidos ao longo dos meses de amostragem, diferenças na proporção de cores dos indivíduos entre o banco e o viveiro, ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.3.). Foram registadas quatro tipos de coloração: esverdeado, creme esverdeado, creme e aquoso.

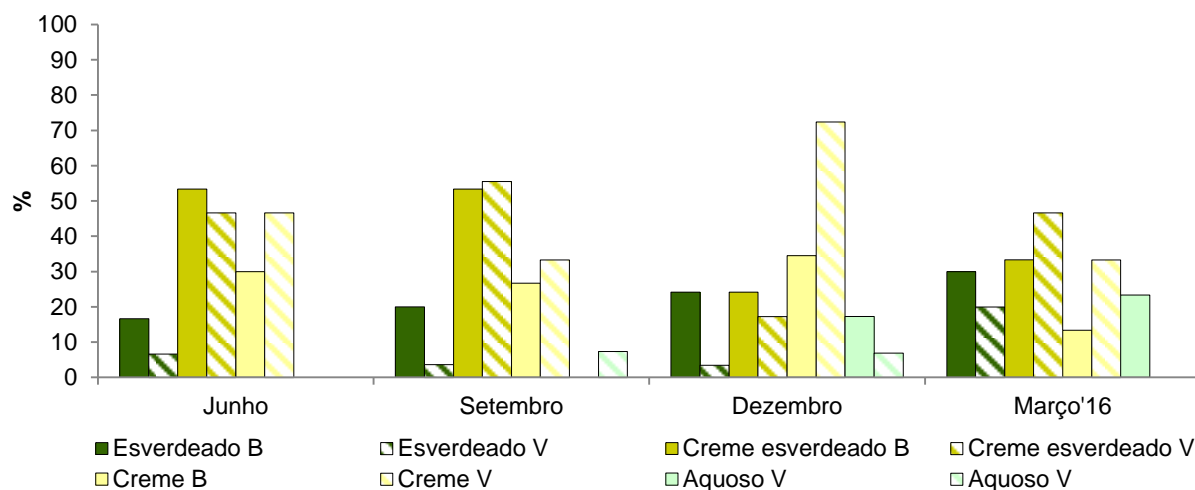


**Figura 3.3.** Coloração global em indivíduos do banco Batalha (A) e do viveiro (B).

No total dos meses, observou-se uma prevalência de indivíduos de cor esverdeada superior no banco natural, acontecendo o mesmo com as ostras com uma coloração aquosa. Este tipo de coloração é considerada desfavorável para as ostras. Relativamente à cor creme, considerada normal, observou-se uma prevalência maior no viveiro. A percentagem de indivíduos esverdeados em todos os meses estudados, foi sempre superior no banco natural. A percentagem de indivíduos “creme-esverdeados” é, ao longo dos meses, semelhante entre os dois locais. Em relação à coloração creme dos indivíduos, pode-se observar que no viveiro a percentagem é sempre maior.

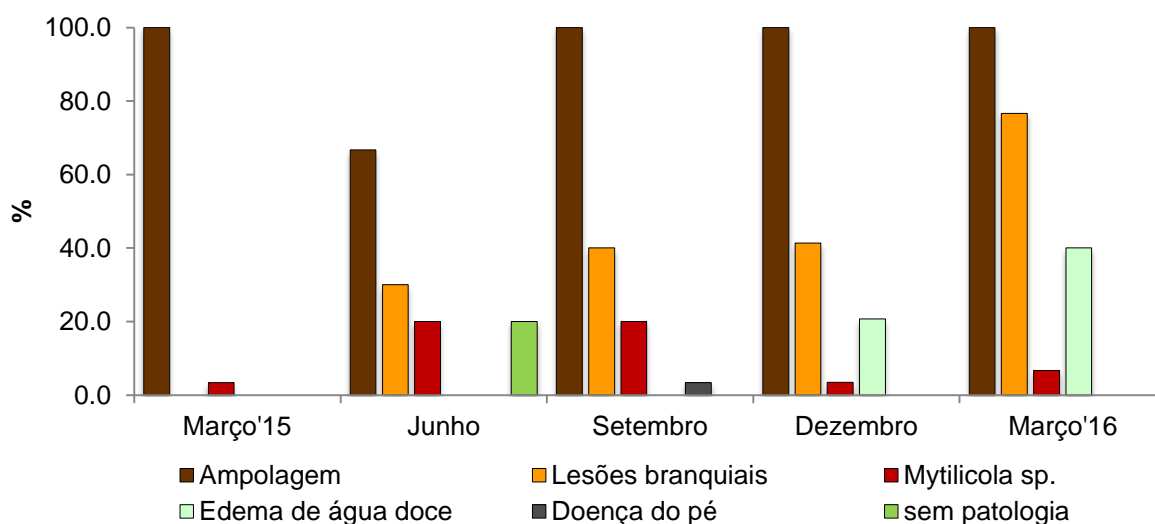
Observaram-se ostras com tonalidade “aquosa” em Setembro no viveiro e nos meses de Dezembro e Março, observou-se uma maior percentagem no banco natural (Figura 3.4.). Segundo a análise estatística feita com o teste- G de independência observa-se que no mês de Junho não há diferenças significativas na coloração das ostras entre o banco e o viveiro

( $p > 0,05$ ). Em Setembro, a proporção de indivíduos esverdeados já é diferente do banco para o viveiro e em Dezembro as proporções de indivíduos esverdeados e cremes também diferem do banco para o viveiro ( $p < 0,05$ ). Em Março apenas se encontram diferenças significativas em indivíduos com a coloração “aquosa”.



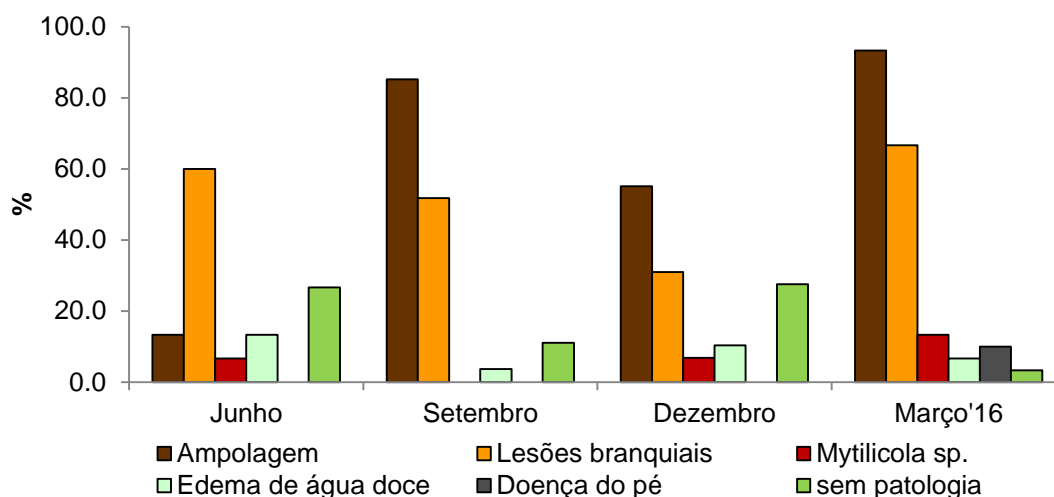
**Figura 3.4.** Coloração dos indivíduos de ostra portuguesa recolhidos no banco natural (B) e viveiro (V) em diferentes meses de amostragem.

Foram registadas lesões e agentes patogénicos visualizados macroscopicamente nos indivíduos recolhidos no banco e no viveiro (Figuras 3.5. e 3.6.).



**Figura 3.5.** Lesões e parasitas analisados macroscopicamente nos indivíduos recolhidos no banco natural Batalha.

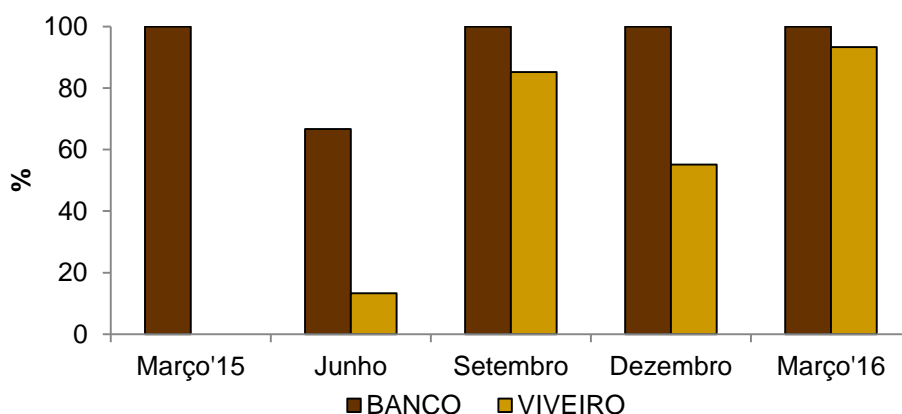




**Figura 3.6.** Lesões e parasitas analisados macroscopicamente nos indivíduos recolhidos no viveiro do canal da Vaia.

No banco da Batalha, em todos os meses de amostragem, excepto em Junho, todos os indivíduos amostrados tinham pelo menos uma lesão ou parasita associados, ou seja, em 149 ostras amostradas em cinco meses, apenas em seis espécimes (Junho) não se observou macroscopicamente qualquer agente patogénico ou lesão. No viveiro, foram encontrados todos os meses indivíduos sem qualquer lesão ou parasita observado macroscopicamente.

A ampolagem foi quase sempre máxima (100%) no banco e com uma prevalência sempre superior à do viveiro. O teste-G de independência revelou que a proporção do total de indivíduos do banco com ampolagem é estatisticamente diferente da proporção do total de indivíduos com ampolagem do viveiro ( $p < 0,05$ ). Fazendo a comparação do banco selvagem com o viveiro em cada mês de amostragem, o mesmo teste revelou que em todos os meses há diferenças entre os locais ( $p < 0,05$ ) excepto em Março de 2016 ( $p > 0,05$ ) (Figura 3.7.)



**Figura 3.7.** Prevalência de ampolagem em indivíduos de ostra portuguesa recolhidos no banco natural e no viveiro entre Março de 2015 e 2016.

No banco natural, observou-se a presença de lesões branquiais em todos os meses exceto no mês de início da experiência (Março de 2015) e um aumento do número de ostras com estas lesões ao longo dos meses. No viveiro observaram-se estas lesões em todos os meses analisados. Nos meses de Junho e Setembro a prevalência de indivíduos com lesões branquiais foi inferior no banco, contrariamente ao que aconteceu nos meses de amostragem que se seguiram. Comparando estatisticamente os dois locais em estudo, segundo o teste-G de independência, não há diferenças significativas entre os mesmos ( $p > 0,05$ ). Apenas se registam diferenças significativas entre os locais, no mês de Junho ( $p < 0,05$ ).

O copépode parasita *Mytilicola* sp. foi persistente ao longo de todo o ano, tendo sido observado em todos os meses nas ostras do banco. A análise estatística do teste-G de independência, revelou que a proporção de indivíduos com este parasita no banco, não é diferente da proporção de ostras parasitadas com *Mytilicola* sp. no viveiro. Apenas se registam diferenças significativas no mês de Setembro, em que não foram encontradas ostras com este parasita no viveiro ( $p < 0,05$ ).

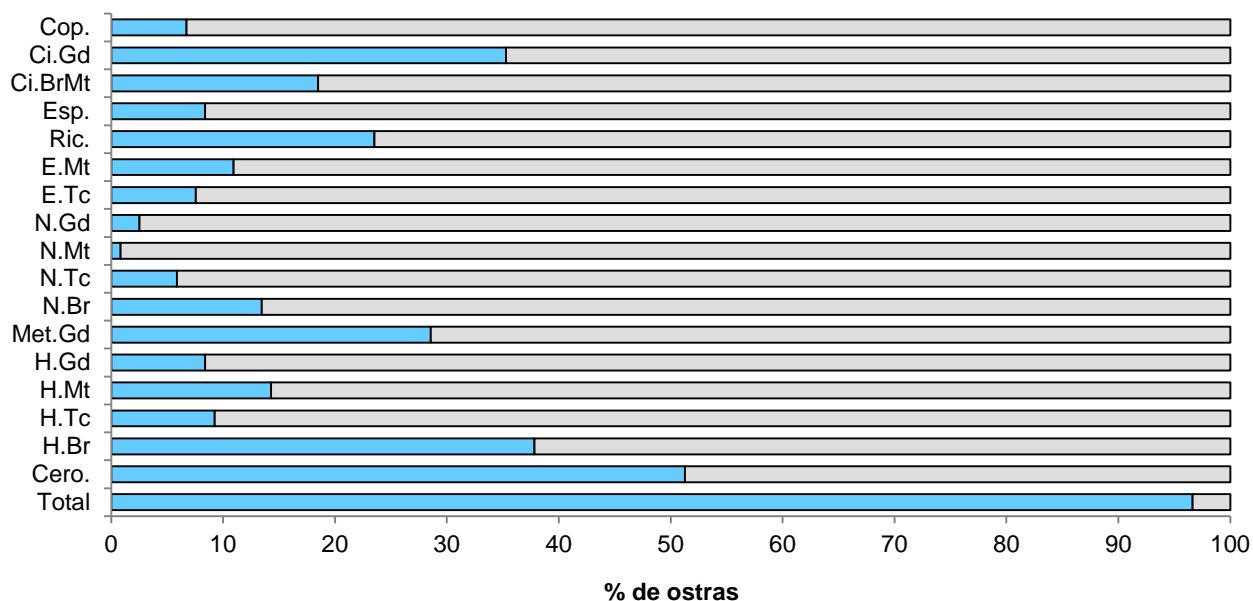
No banco natural destacou-se o aparecimento de um número acentuado de ostras com edema de água doce em Dezembro, aumentando depois em Março de 2016. Já no viveiro todos os meses foram observadas ostras com esta condição. Estatisticamente, existem diferenças significativas na proporção de ostras com edema entre os dois locais ( $p < 0,05$ ). As diferenças mais significativas entre os locais, foram registadas nos meses de Junho em que não se observou edema de água doce nos espécimes do banco contrastando com 13,3% de ostras com edema no viveiro e Março em que 40% das ostras estava com esta condição no banco e no viveiro apenas 6,7%.

A doença do pé teve uma incidência vestigial na população, ao longo de todo o período de estudo tendo-se observado uma percentagem pequena de indivíduos em Setembro no banco (3,3%) e em Março de 2016 no viveiro (10%).

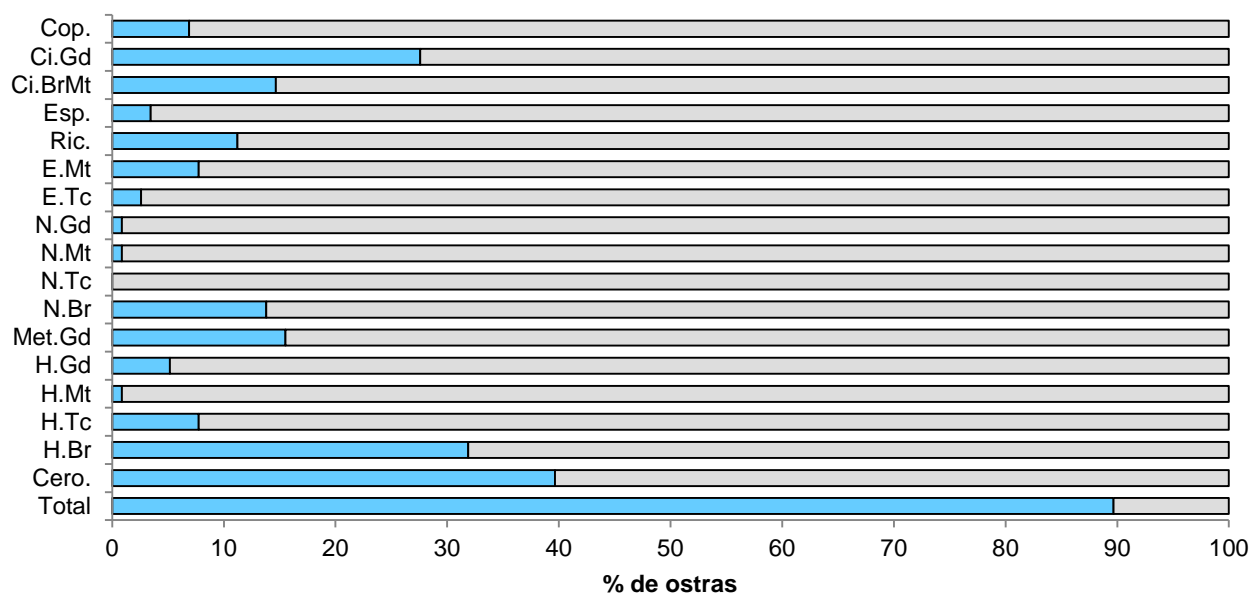
No geral, a população amostrada no viveiro, apresentou menos doenças e lesões observadas macroscopicamente, comparando com o banco natural. Num total de 116 ostras analisadas no viveiro, 20 dos indivíduos não apresentaram qualquer condição patológica. No banco, num total de 119, apenas foram registados 6 indivíduos sem doenças, lesões ou parasitas observados macroscopicamente. Analisando estas observações estatisticamente, através do teste G de independência, essas diferenças consideram-se significativas para a hipótese nula de que não há diferenças nas proporções de indivíduos com lesões e parasitas entre o banco e o viveiro ( $p < 0,05$ ).

### **3.3.2. Histopatologia**

Na análise histopatológica registou-se, no total dos meses de amostragem, uma prevalência de 96,6% e de 89,6% de ostras com pelo menos uma condição patológica, lesões, alterações morfológicas ou parasitas no banco e no viveiro, respectivamente. Nas figuras 3.8. e 3.9., podem-se observar esses resultados e verificar que as lesões ou condições mais prevalentes foram a ceroidose, hemocitose branquial e metaplasia da glândula digestiva. Os ciliados foram os agentes patogénicos de maior prevalência, principalmente na glândula digestiva. No banco natural, a seguir aos ciliados, os parasitas mais prevalentes foram esporozoários (8,4%) e copépodes (6,7%). No viveiro foram os mesmos mas com diferentes prevalências, os copépodes com 6,9% e esporozoários com 3,4%. A hemocitose foi maioritariamente registada no tecido branquial, nos dois locais, seguindo-se a hemocitose no manto, no banco e hemocitose no tecido conjuntivo, no viveiro. Nos dois locais de estudo observou-se com maior prevalência a necrose do tecido branquial, comparando com a destruição de tecido noutros órgãos. Em relação a alterações provocadas pelos exsudados do edema de água doce, observaram-se indivíduos com essas alterações no manto e no tecido conjuntivo, mas com baixas prevalências nos dois locais. No banco 10,9% dos indivíduos apresentaram edema no manto e 7,6% no tecido conjuntivo. No viveiro 7,8% tinham edema no manto e 2,6% no tecido conjuntivo.

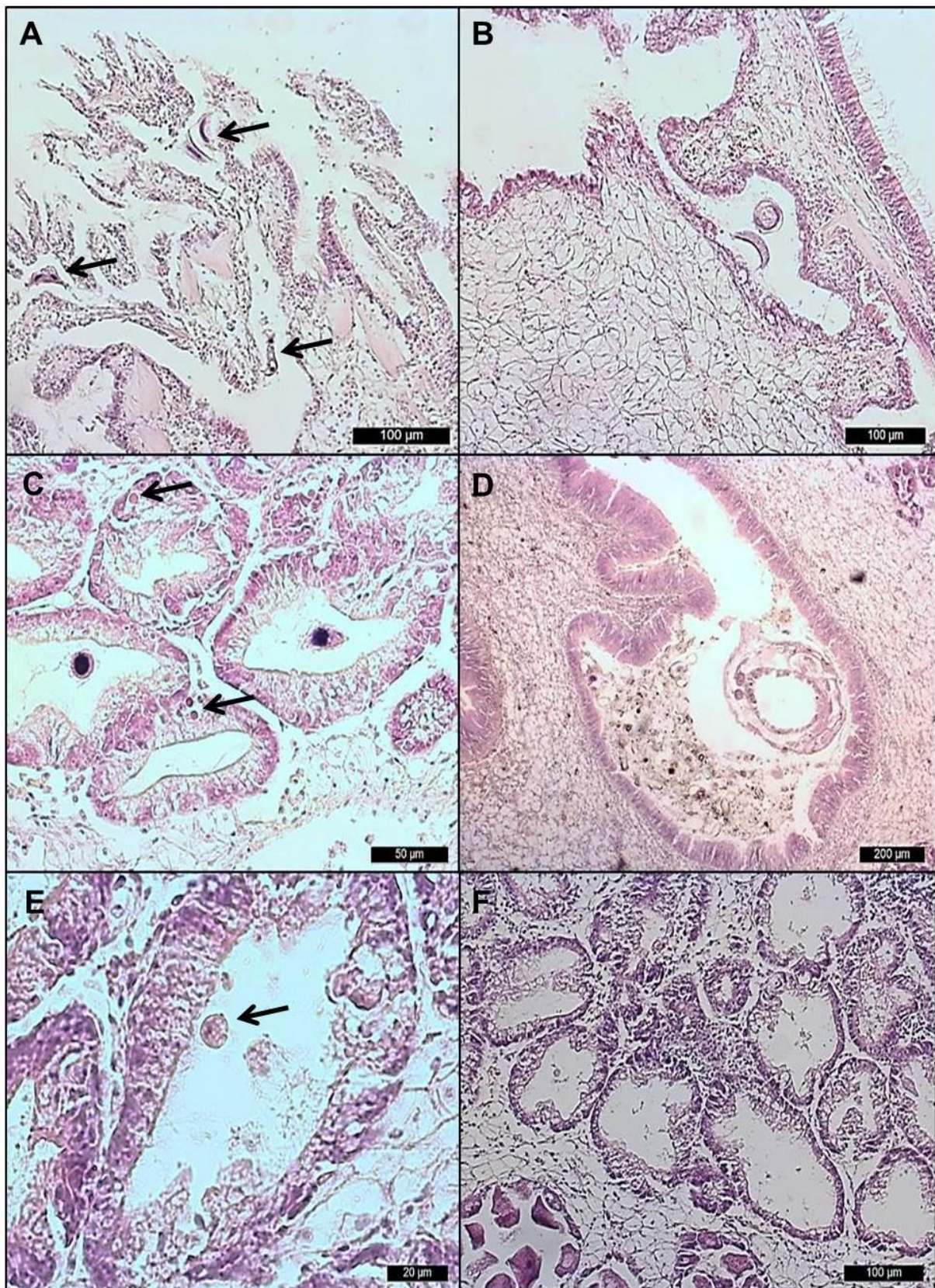


**Figura 3.8.** Lesões ou alterações morfológicas e agentes patogénicos detectados ao microscópio ótico em ostras recolhidas no banco natural. As lesões e agentes patogénicos observados são: Copépodes (Cop.); Ciliados da glândula digestiva (Ci.Gd); Ciliados nas brânquias e manto (Ci.BrMt); Esporozoários (Esp.); Rickétsias (Ric.); Edema no manto (E.Mt); Edema no tecido conjuntivo (E.Tc); Necrose na glândula digestiva (N.Gd); Necrose no manto (N.Mt); Necrose no tecido conjuntivo (N.Tc); Necrose nas brânquias (N.Br); Metalasia na glândula digestiva (Met.Gd); Hemocitose na glândula digestiva (H.Gd); Hemocitose no manto (H.Mt); Hemocitose no tecido conjuntivo (H.Tc); Hemocitose nas brânquias (H.Br); Ceroidose (Cero.).



**Figura 3.9.** Lesões ou alterações morfológicas e agentes patogénicos detectados ao microscópio ótico em ostras recolhidas no viveiro. As lesões e agentes patogénicos observados são: Copépodes (Cop.); Ciliados da glândula digestiva (Ci.Gd); Ciliados nas brânquias e manto (Ci.BrMt); Esporozoários (Esp.); Rickétsia (Ric.); Edema no manto (E.Mt); Edema no tecido conjuntivo (E.Tc); Necrose na glândula digestiva (N.Gd); Necrose no manto (N.Mt); Necrose no tecido conjuntivo (N.Tc); Necrose nas brânquias (N.Br); Metalasia na glândula digestiva (Met.Gd); Hemocitose na glândula digestiva (H.Gd); Hemocitose no manto (H.Mt); Hemocitose no tecido conjuntivo (H.Tc); Hemocitose nas brânquias (H.Br); Ceroidose (Cero.).





**Figura 3.10.** Exemplo de parasitas e lesões detetados neste trabalho em espécimes de *Crassostrea angulata* recolhidos no estuário do Sado. A, Ciliados *Tricodina* sp., em tecido branquial, um pouco necrótico; B, Ciliados *Tricodina* sp., no manto; C, Ciliados *Ancistrocoma* sp. na glândula digestiva e colónias de Ricketsias nas paredes dos túbulos da glândula digestiva (setas); D, Copépode *Mytillicola*

sp. no intestino; E, Esporozoário na glândula digestiva; F, Metaplasia dos ductos e túbulos da glândula digestiva com alguma necrose do tecido.

Os resultados relativos à análise individual das diferenças nos valores médios de cada doença ao longo dos meses entre os dois locais são descritos de seguida. A prevalência das lesões e parasitas ao longo dos meses nos dois locais de estudo estão representadas nas figuras 3.11. e 3.12.

O número de ostras com ceroidose é diferente entre os locais ( $p < 0.05$ ). Em Junho a prevalência foi maior no viveiro, mas nos restantes meses foi superior no banco natural. No viveiro há uma diminuição da prevalência de Junho até Dezembro, havendo um aumento em Março, estatisticamente não significativo.

A hemocitose branquial segue o mesmo padrão, havendo uma prevalência maior no viveiro em Junho, que diminui nos meses seguintes. Com a excepção desse mês, no banco a prevalência de indivíduos com esta condição, é sempre maior, existindo diferenças estatisticamente significativas em todos os meses ( $p < 0,05$ ) menos no último. Quanto à hemocitose no tecido conjuntivo, não se verificaram diferenças significativas entre os fatores, local e mês. A hemocitose no manto foi sempre superior nas ostras do banco ( $p < 0.05$ ) excepto no mês de Março, cujas diferenças não são estatisticamente significativas. A hemocitose na glândula digestiva foi sempre superior no banco natural, não existindo, no entanto, diferenças estatisticamente significativas entre os locais.

A metaplasia dos ductos e túbulos da glândula digestiva, é muito superior no banco nos meses de Setembro e Dezembro, sendo essas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Em Março, observa-se uma maior percentagem no viveiro, no entanto essa diferença não mostra ser estatisticamente significativa.

Relativamente às lesões por destruição ou perda de tecido, necroses, nas brânquias não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os locais. Não foram observados indivíduos com necrose no tecido conjuntivo no viveiro. No banco só em Dezembro é que não foram observadas ostras com este tipo de necrose. Em relação às necroses no manto e na glândula digestiva, as prevalências foram muito reduzidas não existindo diferenças significativas entre os locais. No viveiro foram observados indivíduos com necrose nestes tecidos apenas em Junho. No banco foi registada uma prevalência de 3,4% de ostras com necrose no manto em Dezembro e 10% com necrose na glândula digestiva no fim da experiência.

Quanto às lesões relacionadas com edema no tecido conjuntivo e no manto, não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois locais, embora se possa observar um

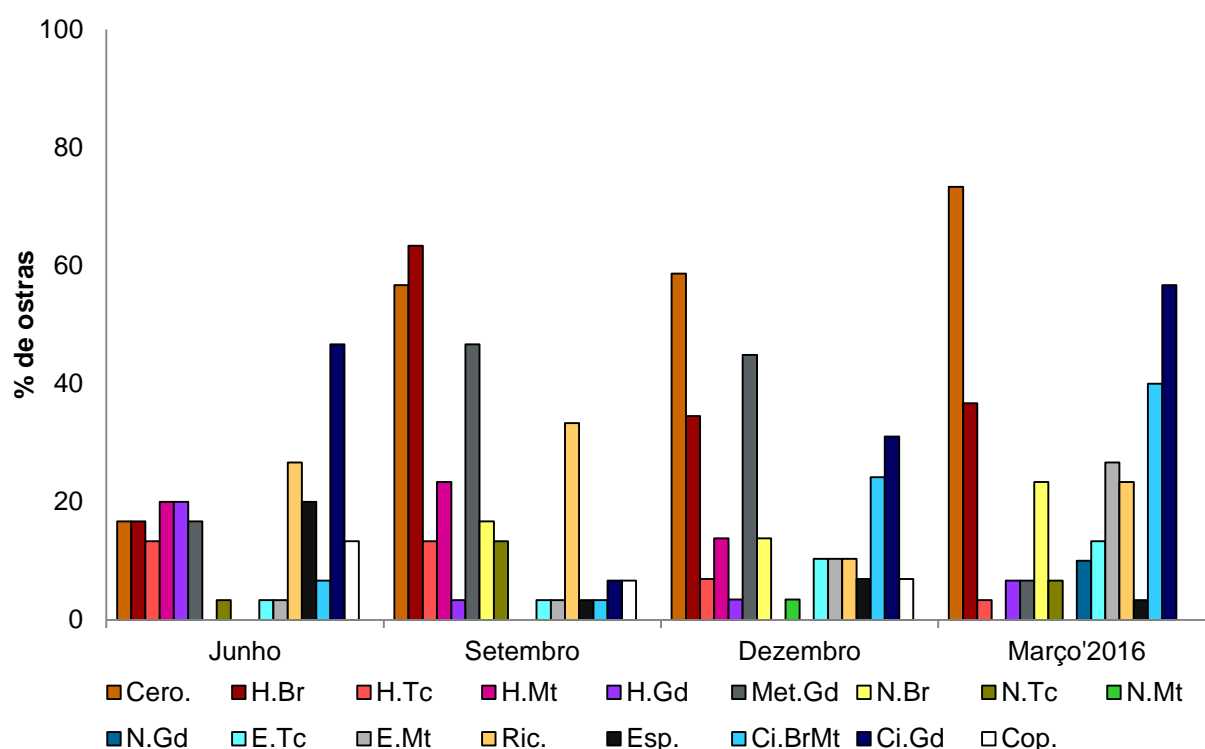


aumento de edema no banco a partir do mês de Dezembro. Também no mês de Dezembro foi possível observar o aumento da prevalência de indivíduos do viveiro com edema no manto.

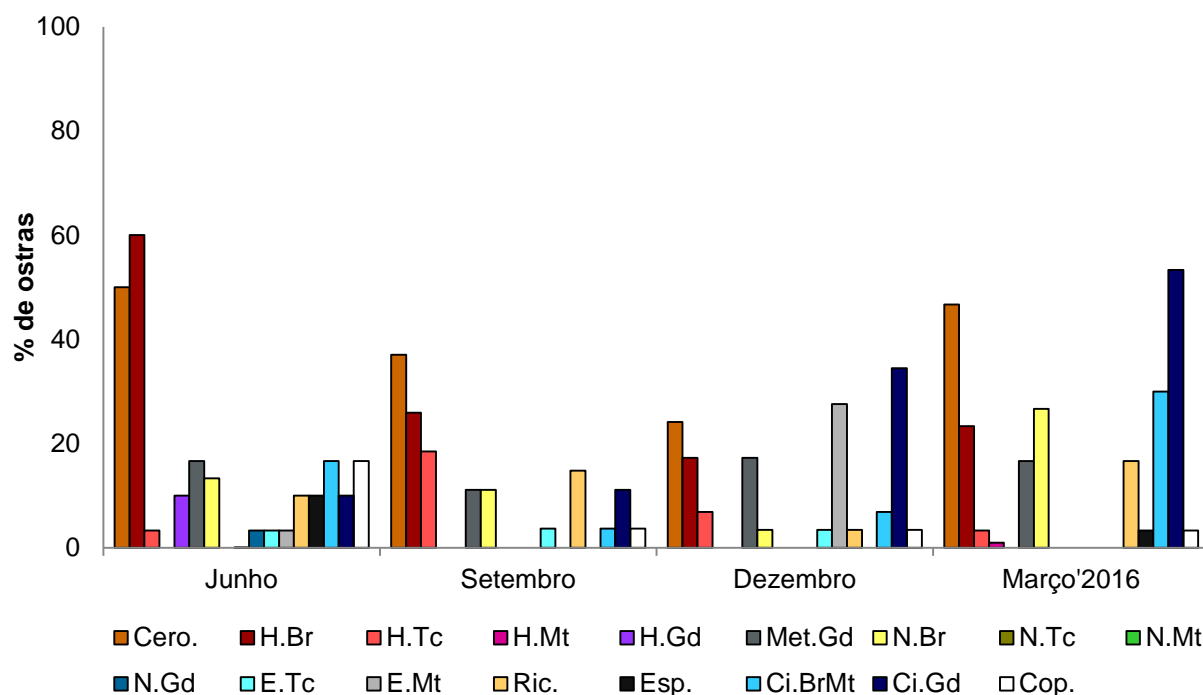
Apesar da prevalência de indivíduos com colónias de *Rickettsia* ser maior no banco ao longo dos meses, esta diferença não é significativa.

Em relação aos esporozoários a prevalência foi sempre maior no banco, exceto no mês de Março que foi igual nos dois locais, no entanto as diferenças encontradas também não são estatisticamente significativas.

Em relação aos ciliados nas brânquias e manto não há grandes diferenças entre os locais. Em Dezembro e Março a prevalências destes parasitas nestes órgãos aumenta nos dois locais. Para os ciliados da glândula digestiva, os valores da prevalência são semelhantes, não se tendo observado diferenças estatisticamente significativas entre os locais. O mesmo se passa com os copépodes.



**Figura 3.11.** Lesões ou alterações morfológicas e agentes patogénicos detectados ao microscópio em ostras recolhidas no banco Batalha, em cada mês de amostragem. As lesões e agentes patogénicos observados são: Ceroidose (Cero.); Hemocitose nas brânquias (H.Br); Hemocitose no tecido conjuntivo (H.Tc); Hemocitose no manto (H.Mt); Hemocitose na glândula digestiva (H.Gd); Metaplasia na glândula digestiva (Met.Gd); Necrose nas brânquias (N.Br); Necrose no tecido conjuntivo (N.Tc); Necrose no manto (N.Mt); Necrose na glândula digestiva (N.Gd); Edema no tecido conjuntivo (E.Tc); Edema no manto (E.Mt); *Rickettsia* (Ric.); Esporozoários (Esp.); Ciliados nas brânquias e manto (Ci.BrMt); Ciliados da glândula digestiva (Ci.Gd); Copépode (Cop.).



**Figura 3.12.** Lesões ou alterações morfológicas e agentes patogénicos detectados ao microscópio em ostras recolhidas no banco viveiro “Anjos”, em cada mês de amostragem. As lesões e agentes patogénicos observados são: Ceroidose (Cero.); Hemocitose nas brânquias (H.Br); Hemocitose no tecido conjuntivo (H.Tc); Hemocitose no manto (H.Mt); Hemocitose na glândula digestiva (H.Gd); Metaplasia na glândula digestiva (Met.Gd); Necrose nas brânquias (N.Br); Necrose no tecido conjuntivo (N.Tc); Necrose no manto (N.Mt); Necrose na glândula digestiva (N.Gd); Edema no tecido conjuntivo (E.Tc); Edema no manto (E.Mt); Rickettsia (Ric.); Esporozoários (Esp.); Ciliados nas brânquias e manto (Ci.BrMt); Ciliados da glândula digestiva (Ci.Gd); Copépode (Cop.).

O teste PERMANOVA revelou que existem diferenças entre os locais banco e viveiro no que diz respeito às doenças, alterações e parasitas observados ao microscópio e também revelou diferenças entre a época do ano/meses (Tabela 3.5). Os testes pareados complementares ao teste PERMANOVA podem ser consultados no capítulo “Anexos”, anexo II. Na comparação entre os dois locais todos os meses mostraram ser estatisticamente diferentes.

**Tabela 3.5.** Tabela resumo dos resultados do teste PERMANOVA.

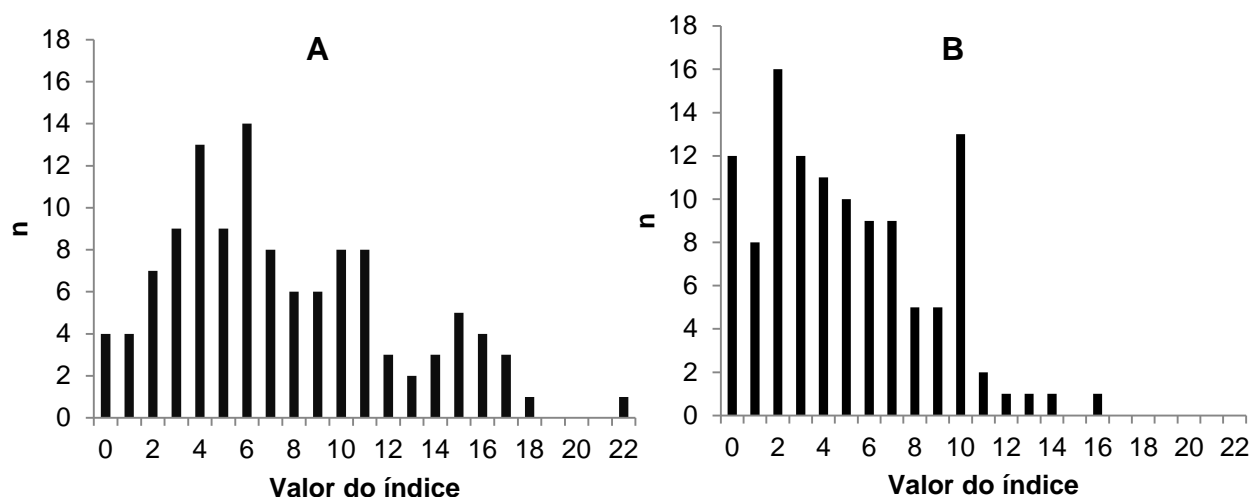
Factor	Pseudo-F	P(perm)
Local	3.809	<b>0.003</b>
Época	6.7316	<b>0.001</b>
Local x Época	5.9538	<b>0.001</b>



A análise SIMPER revelou que nas amostras do banco, o que mais contribuiu para a percentagem de similaridade dentro do grupo foram de forma decrescente: a ceroidose, hemocitose nas brânquias, ciliados na glândula digestiva, metaplasia da glândula digestiva, Rickettsia e ciliados nas brânquias. O que menos contribuiu para essa similaridade foram: necrose na glândula digestiva e tecido conjuntivo, copépodes, edema no tecido conjuntivo, esporozoários e hemocitose no tecido conjuntivo. Relativamente às amostras do viveiro, esta análise de percentagem de similaridades revelou que as variáveis que mais contribuíram para a similaridade dentro do grupo foram: hemocitose nas brânquias, ceroidose, ciliados na glândula digestiva e também nas brânquias e manto, necrose nas brânquias e metaplasia da glândula digestiva. Na comparação entre os dois locais a maior dissimilaridade foi gerada por (ordem decrescente): ceroidose, hemocitose nas brânquias, ciliados na glândula digestiva, metaplasia, Rickettsia, ciliados nas brânquias e manto (Anexo III).

Depois de se ter aplicado o cálculo do índice, IAESO, observaram-se diferenças estatisticamente significativas no estado sanitário das ostras entre os dois locais de estudo ( $p < 0,001$ ). O valor máximo do índice foi encontrado numa ostra do banco natural (IAESO= 22). O valor mais elevado do IAESO registado nas ostras do viveiro foi de 16, considerado como estado “muito grave”. Classificados como “estado crítico”, foram registados 5 indivíduos no banco natural. Com um valor superior a 12, estado considerado “muito grave”, foram observados 19 indivíduos no banco e apenas 3 indivíduos no viveiro. No banco o número máximo de indivíduos com o mesmo valor do índice foi encontrado para o nível “6” ( $n=14$ ), considerado “razoável”. No viveiro a moda foi observada no valor do índice correspondente a “2” ( $n=16$ ), considerado “saudável”. A média do valor do índice foi de  $7,51 \pm 4,70$  e de  $4,99 \pm 3,63$  para o banco e viveiro respectivamente.

Para validar o índice desenvolvido recorreu-se a métricas externas e independentes às aplicadas no seu cálculo. Estas métricas são outras medidas de onde se pode também aferir o estado de qualidade dos indivíduos. Fez-se então uma regressão linear múltipla, com o estado de carnes e o estado de desenvolvimento da gónada de cada ostra amostrada como variáveis independentes e o valor do índice como variável dependente. O resultado desta análise mostrou que o estado de carnes dos indivíduos pode prever o valor ou estado resultante do índice ( $p < 0,05$ ), havendo portanto uma relação entre as duas variáveis, estado de carnes e o resultado do IAESO (Anexo IV).



**Figura 3.13.** Histogramas representativos da distribuição dos indivíduos de *C.angulata* após o cálculo do índice de estado sanitário no banco natural (A) e no viveiro (B).

### 3.4. Discussão

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o estado sanitário das duas populações analisadas, a do banco natural e a do viveiro localizado no esteiro da Vaia. Para isso analisaram-se detalhadamente 265 indivíduos de *C. angulata*. Em nenhuma das populações foram observados episódios de mortalidade.

Outro dos objetivos foi construir um índice semi-quantitativo, para utilização futura em trabalhos de rotina que seja menos subjetivo possível e cujos resultados sejam fáceis de comparar com outros trabalhos.

#### 3.4.1. Observações macroscópicas

Na análise à coloração geral dos tecidos das ostras, observou-se uma maior prevalência de ostras com coloração esverdeada no banco ao passo que no viveiro observou-se uma prevalência maior de ostras com a coloração creme. O número de indivíduos com a coloração creme foi sempre superior no viveiro. No geral, também a prevalência de indivíduos “aquosos” foi superior no banco natural. A coloração dos tecidos moles das ostras é tida como um indicador geral da condição de salubridade das ostras. A cor do corpo das ostras considera-se positiva ou favorável quando apresenta uma tonalidade creme. O tom esverdeado, muitas vezes quase metálico, deve-se à impregnação de sais de cobre (Cachola e Ruano, 2000). Vários autores demonstraram que a coloração verde das ostras é causa de uma elevada concentração de cobre acumulada nos tecidos de vários bivalves (Han e Hung, 1990; Lin e Hsieh, 1999; Jeng *et al.*, 2000). Apesar do cobre ser um elemento

essencial para as funções biológicas dos organismos, em quantidades elevadas pode ter efeito negativo em termos organolépticos, perdendo o seu valor comercial. Como referido anteriormente neste trabalho, o estuário do Sado é um sistema fortemente pressionado por actividades antropogénicas. Estas pressões têm origem principalmente na indústria agroquímica e na exploração de minas de pirites no passado, localizadas na bacia de drenagem do Sado. Estas atividades aumentam os teores em metais como o cobre, chumbo e cádmio, nos sedimentos que são depois absorvidos pelos organismos em contacto com o substrato, como é o caso das ostras que crescem em bancos naturais, enterradas ou sobre a vasa ou lodo. Na zona do canal de Alcácer os valores de alguns destes metais em indivíduos de *C. angulata* podem ser considerados elevados (Cortesão e Vale, 1995). No âmbito do projecto Crassosado, foram feitas análises aos teores de metais em ostras do banco natural da Batalha, bem como em ostras colocadas no viveiro. Relativamente ao elemento “cobre”, que confere a cor esverdeada às ostras, os valores foram sempre superiores em ostras provenientes do banco natural (Anónimo, 2016). Isto pode ser a explicação para o facto de haver sempre mais indivíduos com a tonalidade verde nas ostras analisadas do banco, quando comparadas com o viveiro. As condições ambientais mais desfavoráveis e o tempo de exposição das ostras no banco natural a períodos mais longos de emersão devido à sua localização muito a montante no canal, filtrando uma maior concentração de substâncias, podem ser também uma explicação para a observação, naquele local, de uma maior prevalência de animais com coloração verde. Quanto mais tempo emersas, mais tempo a filtrar estão e portanto maior concentração de metais, neste caso o cobre, acumulada. No viveiro as ostras encontravam-se em mesas numa posição relativamente afastada do substrato e por outro lado estavam sujeitas a um efeito de marés maior, ou seja, ficavam mais tempo fora de água comparando com as ostras do banco natural. Por estas razões, a percentagem de ostras com a coloração esverdeada é menor no viveiro. Há estudos que referem que ostras transplantadas de locais com elevadas concentrações de metais como o cobre, para zonas com outras características que proporcionem concentrações desse metal menores, favorecem a depuração e eliminação gradual do elemento. Wang e Wang (2014) demonstraram que ao fim de quatro meses de depuração em condições laboratoriais as ostras da espécie *Crassostrea sikamea*, passavam a ter menos concentração de cobre e os espécimes começavam a ficar com uma coloração normal. Quando depuradas e colocadas em locais menos contaminados, o cobre nas ostras parece decrescer exponencialmente no tempo nos primeiros meses (Han e Hung, 1990). A acumulação de metais pode não ter efeito direto na sobrevivência dos moluscos, mas podem torná-los mais suscetíveis a infecções por bactérias ou vírus (Okazaki e Panietz, 1981). A qualidade da concha das ostras pode também ser afetada pela elevada concentração de cobre à qual estão expostas (Frazier, 1976). Okazaki e Panietz (1981),

viram que ostras de locais mais contaminados eram mais finas, quebradiças e com várias camadas.

O registo de animais com uma tonalidade aquosa, foi superior no banco natural, em Dezembro e Março de 2016, sendo que estas diferenças foram estatisticamente significativas no último mês de amostragem. A coloração aquosa, associada ao edema de água doce, esteve bem marcada nas ostras recolhidas no banco natural. O edema generalizado é provocado pela persistência de salinidades baixas provocadas por excesso de água doce (Ruano e Dias, 1994; Ruano, 1997). De facto, como apresentado na Figura 2.8., do capítulo anterior, os valores inferiores de salinidade perto do banco natural estudado, foram registados em meados de Janeiro e Fevereiro de 2016. Esta condição será a explicação para o facto de ter sido registado um maior número de ostras no banco natural com coloração aquosa resultante de edema. Como também já referido, estes meses foram associados a períodos de precipitação (dados IPMA não representados) o que pode favorecer a diminuição da salinidade no estuário, principalmente mais a montante, nos últimos meses de amostragem. A prevalência de ostras com aspecto aquoso, acompanha a prevalência de indivíduos diagnosticados com edema de água doce no banco natural, que foi superior nos meses onde houve mais precipitação, principalmente em Março de 2016.

A ampolagem é uma condição que se caracteriza pela formação de ampolas de lodo na face interna da concha provocadas por poliquetas do género *Polydora sp.* No banco natural a prevalência de indivíduos com ampolagem foi quase sempre de 100% e superior à prevalência de indivíduos com ampolagem no viveiro. Os valores de ampolagem não seguem nenhum padrão, no entanto o facto de haver uma maior percentagem de indivíduos com esta condição no banco natural, pode dever-se às diferenças na disposição das ostras nos diferentes locais de estudo. Como já referido, no banco natural as ostras encontram-se diretamente no lodo, já no viveiro estão dispostas em mesas sem contactar com o sedimento de fundo, estando mais tempo fora de água devido às marés e práticas aquícolas. Os trabalhos de Nel *et al.* (1996) e Nell (2007) mostraram que estas práticas diminuem a infecção por poliquetas deste género que provocam ampolagem. Esta condição das ostras não causa morte severa, mas induz um decréscimo na taxa de crescimento e pode levar a mudança de comportamento e da atividade respiratória (Chambon *et al.*, 2007). O lodo, proveniente de resíduos de poliqueta e do substrato, incomoda a ostra que responde, cobrindo a galeria feita pelo parasita, com concha (conchiolina e nácar), despendendo energia para tal (Lunz, 1941; Nell, 2007). Ostras com elevada infestação por *Polydora sp.*, como é o caso das ostras do banco estudado, vêm a sua condição reduzida devido à energia alocada para tapar os canais feitos pelo parasita, estando mais suscetíveis a outros parasitas, aumentando ainda mais a sua fragilidade (Wargo e Ford, 1993). Em Março de

2016, houve um aumento da prevalência de ampolagem no viveiro, não havendo diferenças estatísticas entre os locais estudados. Uma explicação possível é o aumento da precipitação e das condições inverniais que se fazem sentir em todo o estuário, aumentando a suspensão dos sedimentos na coluna de água, que podem atingir as ostras já parasitadas.

A ampolagem raramente causa mortalidade, no entanto as ampolas de lodo interferem na sua comercialização (Bower, 2006) uma vez que as ostras ficam com mau aspecto para serem servidas e se as ampolas de lodo forem perfuradas podem libertar sedimentos, depósitos fecais e metabolitos anaeróbicos como o sulfureto de hidrogénio (Handley e Bergquist, 1997).

A presença de lesões branquiais está bem marcada nas ostras estudadas, não havendo diferenças entre o banco e o viveiro. Está descrito que as lesões nas brânquias são provocadas pela presença de um iridovírus, “Gill Necrosis Virus”, responsável por elevadas mortalidades em *C. angulata* no passado (Comps, 1988). A ostra portuguesa é o hospedeiro mais comum e susceptível (Renault 1996). A doença das brânquias, como é designada, afecta também a ostra japonesa, no entanto em muito menor proporção e com efeitos reduzidos, sugerindo até alguma resistência ao vírus (Renault e Novoa, 2004).

Em relação ao copépode *Mytilicola* sp. não foram observadas grandes diferenças entre os dois locais analisados. Este parasita pode ser encontrado em vários bivalves e em cargas moderadas não parece causar mortalidades. A espécie encontrada nas ostras, parece ser *Mytilicola orientalis* (Bower *et al.*, 1994). Há autores que dizem que este parasita não tem qualquer impacto em ostras, nomeadamente em *C. gigas* (Steele e Mulcahy, 2001), outros dizem que pode haver redução no índice de condição, causar metaplasia no intestino e em caso de infecções elevadas, pode levar à morte do hospedeiro (Grizel, 1985). Este copépode esteve presente nas ostras ao longo do período de estudo, tal como no estudo de Aguirre-Macedo e Kennedy (1999) que descreveram que o parasita esteve presente em *C. gigas* durante todo o ano no estuário do Exe, no Reino Unido. Neste estudo as prevalências rondaram os 3,3 e os 20 %, não sendo elevadas ao ponto de causar por si só, efeitos nos hospedeiros.

O número de indivíduos com doença do pé foi bastante reduzido não havendo diferenças significativas entre os locais de estudo. No entanto, ao contrário do descrito nos trabalhos de Alderman (1985) e Bower *et al.* (1994) os indivíduos de ostra portuguesa diagnosticados com doença do pé, apresentavam as “verrugas” típicas provocadas pela presença do fungo *Ostracomblabe implexa*. Esta condição pode levar à morte dos espécimes com a doença, se a zona de inserção do músculo adutor for afetada e para além disso as ostras infetadas ficam impróprias para comercialização.

As condições em que as ostras se dispõem no viveiro, fornecem a estes animais condições para melhorar o seu estado, quer a sua coloração de tonalidade esverdeada, quer na presença de parasitas como *Polydora sp.* Tal como referido anteriormente, a passagem das ostras que estão dispostas no substrato para sistemas “off-bottom”, como por exemplo as mesas utilizadas no viveiro durante este estudo, fornecem condições que melhoram o aspecto das ostras por estarem ligeiramente afastadas do lodo e dos parasitas bentónicos. Outro aspeto relacionado com a melhoria de condição das ostras no viveiro prende-se com o facto de as ostras poderem ser colocadas “a seco” durante mais horas, o que se torna positivo no combate aos parasitas.

De um modo geral e tendo em conta os aspetos observados na análise macroscópica, a população do banco natural apresenta mais lesões, parasitas e aspectos organolépticos menos positivos que a população do viveiro.

### **3.2.1. Histopatologia**

A análise de lâminas histológicas revelou uma maior percentagem de ostras com pelo menos uma doença, alteração morfológica ou parasita no banco natural, comparando com o viveiro.

A ceroidose, hemocitose nas brânquias e metaplasia da glândula digestiva foram as “lesões” mais prevalentes. Os ciliados na glândula digestiva foram os parasitas mais registados. Os esporozoários e copépodes (*Mytilicola sp.*) foram parasitas também observados nos dois locais, embora numa menor prevalência. No que respeita a lesões, o tecido branquial parece ser o mais afectado, seguindo-se o manto. A inflamação com infiltração hemocitária e a necrose nas brânquias são as mais comuns. Tanto as brânquias, como o manto, são os órgãos mais externos e por isso têm maior contacto com o meio, sendo mais afectados por condições adversas e parasitas. Um dos principais aspetos de uma ostra doente é apresentar acumulação de hemócitos no manto e superfície das brânquias (Galtsoff, 1964). Nos vertebrados e invertebrados aquáticos, as brânquias são os órgãos diretamente expostos e os mais suscetíveis a variações ambientais, sendo portanto, um tecido alvo para diferentes poluentes (Cheung e Wong, 1992) e parasitas.

Na maioria dos levantamentos histopatológicos feitos em ostras do género *Crassostrea sp.*, os parasitas mais comuns, são semelhantes aos observados neste estudo, nomeadamente protozoários como os ciliados, e.g. *Trichodina sp.* e *Ancistrocoma sp.* e metazoários como os copépodes, e.g. *Mytilicola sp.* (Aguirre-Macedo *et al.*, 2007; Batista, 2007; Iglesias *et al.*, 2012; Sabry *et al.*, 2013). Os ciliados são organismos comuns no ambiente marinho e estão

normalmente associados com o manto e brânquias (*Trichodina sp*) e com a glândula digestiva (*Ancistrocoma sp*), sendo vulgarmente reportados nos estudos de histopatologia em ostras. A maioria dos géneros de ciliados que são observados em bivalves, são considerados inofensivos, no entanto em infestações fortes podem afetar o normal funcionamento do organismo, apresentando uma resposta inflamatória e podendo provocar alterações nos próprios tecidos (Boussaïd *et al.*, 1999; Iglesias *et al.*, 2012). Os ciliados podem aumentar a sua densidade em condições adversas e de stress e ter um efeito negativo nas ostras nestas condições (Bower *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 2011).

A ceroidose parece não causar danos nas ostras, fazendo apenas parte de um processo de desintoxicação e excreção do organismo, no entanto, elevadas prevalências de células ceroides podem ser sinal de stress nas ostras (Nascimento *et al.*, 1986). O aumento da ceroidose nas ostras, parece estar relacionado com a presença de alguma doença e/ou parasita, uma vez que indica stress oxidativo induzido pela resposta inflamatória do organismo (Lassudrie *et al.*, 2015). Neste estudo o número de indivíduos com ceroidose, foi no geral superior no banco natural, facto que pode ser explicado pelas condições mais stressantes existentes no local. O mesmo se verificou com a prevalência de indivíduos com hemocitose de vários tecidos, com a migração de um número anormal de células hemocitárias.

A inflamação é a resposta imediata do organismo a uma lesão ou agente estranho, que envolve a constrição de vasos e seios da hemolinfa, bem como a infiltração de hemócitos nos tecidos infetados ou lesionados (Fisher, 1986). Em grande parte das doenças e parasitoses em bivalves ocorre uma resposta inflamatória (Bower *et al.*, 1994). Por exemplo, a presença de ciliados e copépodes em vários tecidos de ostra, provoca uma resposta com a aglomeração de hemócitos nas lesões por eles provocadas (Iglesias *et al.*, 2012). Não só a presença de parasitas provoca hemocitose nos tecidos. Nascimento *et al.* (1986) reportam que vários factores ambientais podem causar stress e produzir infiltração hemocitária nas ostras. Como já mencionado, o banco natural é mais exposto a condições stressantes para estes animais, quer pela maior prevalência de parasitas, quer pelas grandes amplitudes dos factores abióticos ao longo do ano e também pela maior incidência de contaminantes. A hemocitose nas brânquias está certamente relacionada com as lesões branquiais reportadas nas observações macroscópicas. Estas lesões, tendo sido provocadas pelo “Gill necrosis vírus”, são histologicamente caracterizadas por uma infiltração maciça de células hemocitárias em redor da lesão, e dependendo do estágio da infecção, pode haver necrose tecidular (Comps, 1988). Aparentemente as ostras conseguem recuperar de uma lesão, havendo cicatrização de lesões antigas (Comps, 1970) e nessas provavelmente já não se observa hemocitose. A hemocitose no manto e na glândula digestiva foi também quase

sempre superior nas ostras do banco, o que se pode dever tanto à presença das lesões já reportadas, como à presença de parasitas.

A prevalência de indivíduos com metaplasia na glândula digestiva foi superior no banco natural, com cerca de 28,5 % de prevalência, contrastando com 15,5 % de ostras analisadas do viveiro. Este valor ronda os 20% de incidência referidos por Ruano e Dias (1994). A ocorrência de metaplasia nos ductos e túbulos da glândula digestiva é frequente e pode ser acompanhada da perda de cílios do epitélio e da hipervacuolização das suas células (Ruano e Dias, 1994) podendo afetar o normal funcionamento do órgão. O adelgaçamento das paredes dos ductos e túbulos da glândula digestiva pode estar relacionado com fatores como a presença de parasitas, como copépodes *Mytilicola sp.* já referidos, ou a presença de contaminantes. Como já foi mencionado, a zona mais a montante do estuário do Sado, onde se situa o banco natural, é uma zona mais afectada pela concentração de contaminantes, o que pode estar na origem da maior prevalência de animais com esta condição. No entanto, pode ser discutível se o estreitamento das paredes destes órgãos não passa apenas de uma condição da própria digestão ou carência de alimento (Ruano-comunicação pessoal).

Quanto às lesões com perda de tecido (necroses) não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois locais e as prevalências são reduzidas, com a exceção da necrose branquial. A necrose no tecido branquial foi consistente ao longo do período de estudo e parece estar relacionada com as lesões branquiais e infiltrações hemocitárias observadas, havendo um aumento no último mês de experiência, tanto no banco como no viveiro, que pode ser explicado pelo maior número de ciliados encontrados nas brânquias e manto. Também no último mês da experiência, houve uma ligeira prevalência de indivíduos com necrose no epitélio da glândula digestiva, que também se pode dever ao aumento de ciliados neste órgão. A presença de ciliados em elevadas prevalências pode levar a uma resposta inflamatória com deformação e alteração do epitélio de alguns tecidos (Boussaïd *et al.*, 1999).

No que concerne às lesões relacionadas com edema do tecido conjuntivo e manto, estão claramente relacionadas com o registo macroscópico feito de ostras com edema e coloração aquosa, resultante do excesso de água doce proveniente da precipitação.

Foram observadas colónias de *Rickettsia* nas ostras analisadas, tanto no banco como no viveiro, e embora a prevalência tenha sido superior no primeiro, não há diferenças estatísticas significativas. Ao contrário de Renault e Cochenne (1994) que só encontraram estas colónias no epitélio branquial de *C. gigas*, neste trabalho a maioria foi observada no epitélio da glândula digestiva, estômago e intestino, o que está de acordo com outros autores (Azevedo e Villalba, 1991; Carballal *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2005).



Aparentemente, estes organismos, que se inserem entre as bactérias e os vírus, não estão relacionados nem causam patologias, no entanto, com uma elevada prevalência de Rickettsias nos órgãos afectados, estes podem ver as suas funções comprometidas (Renault e Cochenec, 1994). O desaparecimento dos cílios apicais com lise das células branquiais epiteliais próximas de colónias do tipo das Rickettsias, sugerem que estes organismos podem estar associados a mortalidades em ostras *Crassostrea rizophorae*, da região estuarina do rio Parnaíba, no nordeste do Atlântico costa do Brasil (Azevedo *et al.*, 2005).

Foram encontrados esporozoários na glândula digestiva das ostras do banco, numa prevalência superior à do viveiro, mas sem diferenças estatisticamente significativas. A presença de esporozoários em bivalves é a causa mais comum de doenças que podem resultar em mortalidade. Pode-se destacar *Bonamia ostreae* e *Marteilia refringens* responsáveis por mortalidades severas em *Ostrea edulis*, na Europa e, talvez dos mais conhecidos, *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease) e *Perkinsus marinus*, responsáveis por afetarem gravemente a produção de *C. virginica* nos Estados Unidos da América, por estarem associados a elevadas mortalidades (Renault, 1996). Neste estudo, não foi feita a identificação dos esporozoários observados, no entanto não está descrito a presença de esporozoários que provoquem mortalidade em ostras *Crassostrea sp.* em Portugal.

Outros dos parasitas registados nas amostras analisadas foram os ciliados e os copépodes. Os copépodes encontrados são do género *Mytilicola sp.* As prevalências obtidas são baixas e estão de acordo com as prevalências encontradas na observação macroscópica, no entanto tem de se ter em conta que por vezes, na análise anatomo-patológica, estes parasitas podem sair do organismo e não estarem depois presentes para observação nas lâminas histológicas, ou seja, por vezes são observados durante a amostragem no laboratório e não nas imagens histológicas e vice-versa. Estes copépodes foram registados com prevalências semelhantes embora com intensidade variável, em várias espécies de ostras num estudo feito na Califórnia, onde a presença dos parasitas provocou danos no epitélio gastrointestinal, com inflamação focal em redor das lesões (Moore *et al.*, 2011). A prevalência de ciliados tanto nas brânquias e manto, como na glândula digestiva é, no total dos meses superior no banco, não havendo no entanto diferenças estatísticas. Há autores que referem que os ciliados não provocam qualquer reação nas ostras. Sabry *et al.* (2013) descreve que não observou qualquer reação de defesa em *Crassostrea rhizophorae*, nos órgãos parasitados por ciliados (brânquias e glândula digestiva), no entanto descreve que a intensidade de infecção foi baixa. A maioria das infecções são inócuas a uma intensidade baixa, mas está descrito que infecções pesadas de *Trichodina spp.* em *C. angulata*, em França, incitaram à erosão dos filamentos branquiais, emaciação e mortalidade. Estes

ciliados podem ter sido um invasor secundário de ostras portuguesas aquando das mortalidades provocadas pelo iridovirus da doença das brânquias (Bower *et al.*, 1994; Ruano, 2008). Cáceres-Martínez *et al.* (2010), não observou reação hemocitária nos locais da glândula digestiva onde os ciliados estavam agarrados, mas observou os mesmos envoltos de muco. A excessiva produção de muco pela presença de ciliados nas brânquias pode obstruir as lamelas branquiais e interferir na respiração (Boussaid *et al.*, 1999). Os próprios ciliados ao se agarrarem às lamelas podem obstruir os canais por onde passa a água e interferir na respiração, causando anoxia nessas áreas (Pauley *et al.*, 1967). Como escrito anteriormente, os ciliados não parecem causar danos graves ao hospedeiro, criando-lhes apenas alguma debilidade. Por outro lado, nos casos em que já estão debilitados podem-se tornar oportunistas por lhes ser “facilitada” a entrada acabando por enfraquecer ainda mais o seu hospedeiro. As ostras debilitadas ficam suscetíveis à invasão por ciliados e a outros protozoários, que normalmente não apresentam grande problema, mas que podem causar a morte aos hospedeiros em condições mais fracas (Pauley *et al.*, 1967). Embora os ciliados como *Trichodina spp.* e *Ancistrocoma spp.* sejam comuns em estudos de histopatologia de ostras, estes geralmente tornam-se abundantes em condições adversas (Moore *et al.*, 2011).

A análise estatística com o teste PERMANOVA, revelou, que ao nível das lesões, alterações morfológicas e parasitas detectados microscopicamente, o banco e o viveiro são diferentes. Estas diferenças têm sido discutidas ao longo deste capítulo e de facto recaem em aspetos como a forma com que as ostras estão dispostas nos locais, a carga de contaminantes, as condições ambientais e a sua interligação com a presença de lesões e parasitas. No banco há mais indivíduos com lesões, alterações morfológicas e/ou parasitas que no viveiro. A presença de parasitas e as suas infestações, respondem a fatores como temperatura, salinidade, densidade do hospedeiro e nível de cultivo entre marés (Gosling, 2003). Como supramencionado, as ostras dispostas no viveiro parecem ter melhores condições, não estando efetivamente em contacto com o substrato e ficando mais tempo fora de água. Está descrito que o aumento da exposição das ostras ao ar, diminui significativamente a incidência de infecções, como por exemplo por poliquetas. As infestações, podem ser evitadas através do cultivo de ostras acima do nível extremo da maré baixa e 0,5 m acima do substrato de lodo (Handley e Bergquist, 1997). As condições ambientais têm também bastante influência no estado das ostras e na relação parasita-hospedeiro. A diferença entre o bem-estar de uma população de bivalves e os níveis de stress pode-se dever à resposta insuficiente do hospedeiro e/ ou a fatores ecológicos desfavoráveis. O material sólido em suspensão pode ao sedimentar sobre um banco de ostras provocar debilidade aos animais, podendo até levar à morte por colmatção das brânquias (Ruano, 2008). As ostras no banco

natural estão constantemente a debitar energia no combate a este tipo de fatores, ficando mais suscetíveis para a intrusão de parasitas. As mortalidades associadas a doenças são particularmente graves quando as condições ambientais são favoráveis a parasitas, como é o exemplo do protozoário, *Perkinsus marinus*, em que temperaturas e salinidades elevadas, aumentam significativamente seu desenvolvimento e atividade no ambiente externo e dentro do hospedeiro. O aumento da temperatura e salinidades elevadas, parecem favorecer o aumento de prevalência de parasitas (Bower *et al.*, 1994; Imanaka *et al.*, 2001; Bower, 2006; Tun *et al.*, 2008). O aumento de *Marteilia refringens* e *M. sydneyi* em bivalves está diretamente relacionado com o aumento de temperatura, com a severidade a aumentar no final do verão (Bower, 2006). O fenómeno conhecido como “Summer mortality” é caracterizado por mortalidades de indivíduos de *C. gigas* quando a temperatura da água aumenta (Dégremont *et al.*, 2007). Embora o fenómeno não esteja bem explicado, parece ser uma combinação de fatores ambientais e stress fisiológico como a presença de parasitas e reprodução. O estágio em que se encontram no ciclo de vida, também afeta a predisposição das ostras em “combater” as doenças. Após desova, as ostras estão mais frágeis devido ao elevado consumo de energia e é nessa altura que os sinais de patologias começam a desenvolver-se (Imanaka *et al.*, 2001). Neste estudo as lesões e parasitas encontrados foram diferentes entre os locais e entre os meses. A sua observação não foi regular, mas nota-se um aumento de protozoários depois do mês de Setembro, mês a partir do qual se deixaram de registar ostras em desova e as temperaturas começaram a baixar (capítulo 2.), sugerindo que estes parasitas aproveitaram o desgaste das ostras para a sua intrusão no organismo. Da mesma forma, poluentes nocivos nos ambientes podem ter impacto negativo no hospedeiro e nos mecanismos de defesa (de Montaudouin *et al.*, 2010). A infiltração de hemócitos nos tecidos de moluscos bivalves tem sido reportada como uma resposta típica à poluição ambiental (Gold-Bouchot *et al.*, 1995; Tay *et al.*, 2003; De La Rua *et al.*, 2005; Vaschenko *et al.*, 2013). De la Rua *et al.* (2005) refere que indivíduos de *C. angulata*, podem acumular metais nos órgãos e tecidos numa proporção semelhante ao grau de contaminação do ambiente. Nesse estudo, os autores descrevem que os espécimes de ostra portuguesa expostos a uma determinada concentração de cobre apresentavam alterações nas brânquias, glândula digestiva e coração, como a desorganização das células ciliares, hiperplasia, perda e alterações das lamelas branquiais; inflamação na glândula digestiva com o aumento de “células castanhas” e estreitamento do epitélio dos túbulos da glândula digestiva (metaplasia); destruição do tecido conjuntivo no coração, entre outras alterações.

As lesões e parasitas registados neste estudo que mais contribuíram para diferenciar os dois locais foram a hemocitose e necrose branquiais, ciliados tanto nas brânquias e manto,

como na glândula digestiva e metaplasia. A ceroidose e as colónias de *Rickettsia* encontradas, também tiveram o seu peso, embora não tenham um impacto tão grande nas ostras. De facto, de acordo com a literatura apresentada ao longo desta discussão, estes parecem ser os órgãos mais afectados nas populações de ostra, neste caso concreto da ostra portuguesa do estuário do Sado. O modo de exposição/cultivo das ostras, a presença de contaminantes, como os metais dissolvidos na água, provenientes de atividades de exploração agrícola e mineira, são por si só fatores que influenciam o estado das ostras neste sistema, causando alguma debilidade da qual parecem beneficiar os parasitas. As diferenças observadas entre os dois locais parecem dever-se à melhoria de condições do banco para o viveiro. Para além das ostras no viveiro não estarem em contacto com o substrato, estão mais afastadas do ponto de origem dos contaminantes como os metais, mais a montante do canal de Alcácer do Sal.

O objetivo de desenvolver um índice simples de avaliação do estado sanitário das ostras – IAESO - elaborado neste trabalho, é facilitar a interpretação e a objetividade que uma avaliação histopatológica necessita. O IAESO, poderá ser utilizado em trabalhos de rotina e permitirá uma comparação de resultados mais correta e uniforme. Neste estudo o índice veio facilitar a interpretação dos resultados, ficando claras as diferenças entre os dois locais de estudo. As ostras em pior estado foram encontradas no banco, havendo vários indivíduos no pior estado da classificação (estado crítico). O estado de carnes dos indivíduos, pode prever o estado sanitário em que as outras se encontram. No entanto, é necessário que este índice seja testado noutros estudos do mesmo género para poder ser implementado e validado.

A maior prevalência de lesões como metaplasia, de condições como a ampolagem ou edema, no banco natural, refletem as condições edafoclimáticas e hidrológicas da zona do estuário onde se situa, e são o reflexo de um *stress* fisiológico persistente, associado, por vezes, a níveis de poluição elevados. Esse efeito é também refletido numa maior prevalência de parasitas como os ciliados que, devido à fragilidade do indivíduo, migram para o interior de departamentos orgânicos. A transposição das ostras de bancos mais a montante para zonas do estuário mais próximas da Baía Central, pode contribuir para uma melhoria significativa da sua condição fisiológica. Esta diminuição da pressão ambiental sobre a fisiologia dos animais faz com que os caracteres organolépticos dos animais melhorem significativamente, o que contribui para a sua valorização comercial.

## **CAPÍTULO 4.**

# **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

#### 4. Considerações finais

Este estudo teve como principais objetivos a caracterização do ciclo reprodutivo, fase adulto, nomeadamente analisando com detalhe a gametogénese da ostra portuguesa no estuário do Sado, bem como a avaliação do seu estado sanitário identificando lesões e agentes patogénicos. Para além destes objetivos, pretendeu-se comparar o estado sanitário da população estudada do banco natural, com espécimes da mesma população colocados num viveiro, no mesmo estuário mas com características diferentes e ainda desenvolver um índice, que facilitasse e uniformizasse a compreensão dos resultados histopatológicos, diminuindo a subjetividade que uma avaliação apenas qualitativa pode ter.

No que respeita ao ciclo reprodutivo, a população de *C. angulata* iniciou a proliferação de gâmetas no fim do inverno, início da primavera. Foi possível determinar que a desova se iniciou com o aumento da temperatura, acima dos 18°C e o pico de ostras neste estado deu-se em pleno Verão. Nos meses de Inverno não foram observadas ostras maduras nem em desova. À medida que os gâmetas se desenvolvem a área ocupada pela gónada, vai aumentando, ocupando mais espaço no organismo e portanto, a maior área de gónada encontrada foi determinada nos estados III e IV (maturação e desova).

A monitorização de factores ambientais como a temperatura e a salinidade, perto do banco natural em estudo, foi importante uma vez que todos os aspectos da biologia das ostras dependem destes factores e neste caso concreto, permitiu apurar a sua influência no ciclo gametogénico.

O conhecimento sobre o estado de maturação e o período de desenvolvimento de gâmetas em que as ostras se encontram num sistema particular como o estuário do Sado, é um conhecimento base para a gestão de um recurso e para apoiar o sector aquícola, permitindo conhecer o melhor período de colocação de coletores de semente para produção em aquacultura, bem como providenciar informação para produção em maternidades. De futuro, seria essencial proceder-se a ações concretas de captação de semente nos bancos de ostra do Sado, de forma a aumentar a produção e promover ensaios de repovoamento dos bancos abandonados, com semente e juvenis recrutados nos bancos ativos de modo a reduzir o esforço de apanha nos bancos existentes. Seria importante avaliar os locais mais favoráveis para obtenção de espécimes com maior qualidade. Seria também fundamental estudar o potencial fecundativo das populações e avaliar a capacidade do estuário em suportar essas populações.

Na caracterização do estado sanitário das ostras, observou-se no geral, uma baixa patogenicidade dos agentes patogénicos detetados nos espécimes de *C. angulata* do

estuário do Sado, refletindo-se na ausência de episódios de mortalidade significativos. Os parasitas e as lesões encontrados, não apresentam por si só, severidade para o hospedeiro, no entanto, ao atuarem em conjunto e / ou em de condições ambientais desfavoráveis, podem tornar-se prejudiciais. Para o consumo humano, os agentes detetados não são prejudiciais nem apresentam risco de saúde, no entanto, alguns podem levar à alteração dos caracteres organolépticos, inviabilizando a qualidade das ostras.

A população que foi colocada no viveiro revelou uma melhor condição e menos doenças, lesões e parasitas que a população do banco natural. As condições do viveiro tiveram uma influência marcante sobre as ostras, podendo ser um contributo para uma melhoria significativa da sua condição fisiológica. A transposição do banco natural a montante para o viveiro mais a jusante, para “afinação”, confirma as vantagens de gestão do habitat para criação de condições para desenvolvimento de exemplares de melhor qualidade.

A criação do índice para avaliação do estado sanitário das ostras –IAESO, foi importante uma vez que a partir deste estudo o índice poderá servir para facilitar os trabalhos de rotina de avaliação do estado destes animais e poderá ser utilizado em vários trabalhos de investigação. O índice desenvolvido poderá ainda ser adaptado a outras espécies de bivalves, com a vantagem de tornar as avaliações mais objetivas.

No que diz respeito ao estudo do estado sanitário, ficou a faltar o despiste de agentes detetáveis por técnicas de biologia molecular, como é o caso de *Ostreid herpesvirus 1*, que pode constituir um potencial problema no cultivo de ostras no Sado.

Este estudo permitiu aumentar o conhecimento do ciclo reprodutivo e do estado sanitário em que as ostras em ambiente natural se encontram, bem como técnicas de melhoria da sua qualidade que são essenciais para o desenvolvimento da aquacultura e de medidas de gestão do *stock* e da actividade em si. A transferência e introdução de organismos aquáticos têm sido reconhecidas como as maiores causas de dispersão de doenças. Uma forma de mitigar o impacto que doenças não-nativas possam ter em populações como a população de ostra portuguesa no estuário do Sado, é implementar ou reforçar programas que evitem a introdução de espécies que possam ser portadoras de outros agentes patogénicos.

O estudo desta espécie, torna-se prioritário no contexto da aquacultura nacional, tanto pelo valor socioeconómico que esta representa, bem como pela defesa do património genético da ostra portuguesa.

## **CAPITULO 5.**

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## 5. Referências bibliográficas

- Aguirre-Macedo, M. L., Simá-Álvarez, R. A., Román-Magaña, M.K. e Güemez-Ricalde, J. I. (2007) 'Parasite survey of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in coastal lagoons of the southern Gulf of Mexico', *Journal of Aquatic Animal Health*, 19(4), pp. 270–279.
- Aguirre-Macedo, M. L. e Kennedy, C. R. (1999) 'Diversity of metazoan parasites of the introduced oyster species *Crassostrea gigas* in the Exe Estuary', *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79(1), pp. 57–63.
- Alderman, D. J. (1985) 'Shell Disease of Oysters', *Fiches D'identification des Maladies et Parasites des Poissons, Crustacés et Mollusques*, No. 16. ICES, Copenhagen, 4 pp.
- Amemiya, I. (1925) 'Hermaphroditism in the Portuguese oyster [4]', *Nature*, p. 608.
- Anderson, M. J., Gorley, R. N. e Clarke, K. R. (2008) '*PERMANOVA + for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods*'. Edited by U. PRIMER-E: Plymouth.
- Anónimo (2016), 'Estado atual da ostra portuguesa (*Crassostrea angulata*) no estuário do Sado, ameaças e oportunidades para a sua exploração como recurso – CRASSOSADO'. MARE/FCUL: Cabral, H., Costa, J. L., Chainho, P., Marques, F., Portela, T.; IPMA: Ruano, F., Angélico, M. M., Lourenço, H., de Oliveira, P. B., Bandarra, N., Grade, A.; CESAM/UA: Freitas, R., Chiesa, S., Moreira, A., Pires, A.; ICNF: Fernandes, M. J., Falcão, C., Silva, C. Relatório final, 98p.
- Aranda, D., Enríquez-Díaz, M., Lango-Reynoso, F., Brulé, T., Montero, J. e Cárdenas, E. B. (2014) 'Reproductive Strategies of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in Tropical Lagoons of the Mexican Gulf of Mexico', *Journal of Shellfish Research*, 33(1), pp. 145–152.
- Arzul, I., Renault, T. e Lipart, C. (2001a) 'Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: Demonstration of interspecies transmission', *Diseases of Aquatic Organisms*. Inter-Research, 46(1), pp. 1–6.
- Arzul, I., Renault, T. e Lipart, C. e Davison, A. J. (2001b) 'Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves', *Journal of General Virology*. Society for General Microbiology, 82(4), pp. 865–870.
- Arzul, I., Renault, T., Thébault, A., e Gérard, A. (2002) 'Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults', *Virus Research*, 84(1–2), pp. 151–160.
- Azevedo, C., Mendonça, I. e Matos, E. (2005) 'Ultrastructural Analysis of Rickettsia - like Organisms in the Oyster *Crassostrea rizophorae* from the Northeastern Atlantic Coast of Brazil', *Brazilian Journal of morphological Sciences*, 22, 5–8.
- Azevedo, C. e Villalba, A. (1991) 'Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia)', *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(1), pp. 75–81.
- Rico-Villa, B., Pouvreau, S. e Robert, R. (2009) 'Influence of food density and temperature on ingestion , growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*', *Aquaculture*, 287(3): 395-401.
- Barber, B. J. (1996) 'Gametogenesis of eastern oysters , *Crassostrea virginica* (Gmelin ,

1791), and pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in disease- endemic lower Chesapeake Bay', *Journal of Shellfish Research*, 15, pp. 285–290.

Barber, Bruce J. e Blake, N. J. (2006) 'Chapter 6 Reproductive Physiology', *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 35(C), pp. 357–416.

Batista, F. M. (2007) 'Assessment of the aquacultural potential of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*', Tese de Doutoramento, Universidade do Porto, Portugal, p. 302.

Batista, F. M., Leitão, A., Fonseca, V. G., BenHamadou, R., Ruano, F., Henriques, M. A., Guedes-Pinto, H. e Boudry, P. (2007) 'Individual relationship between aneuploidy of gill cells and growth rate in the cupped oysters *Crassostrea angulata*, *C. gigas* and their reciprocal hybrids', *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 352(1), pp. 226–233.

Batista, F.M., López-Sanmartín, M., Grade, A., Morgado, I., Valente, M., Navas, J.I., Power, D.M. e Ruano, F. (2015) 'Sequence variation in ostreid herpesvirus 1 microvar isolates detected in dying and asymptomatic *Crassostrea angulata* adults in the Iberian Peninsula: Insights into viral origin and spread', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 435, pp. 43–51.

Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F. e Gerard, A. (1998) 'Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis', *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226(2), pp. 279–291.

Bougrier, S., Raguenes, G., Bachère E., Tigé, G. e Grizel, H. (1986) 'Essai de réimplantation de *Crassostrea angulata* en France. Résistance au chambrage et comportement des hybrides *C. angulata* - *C. gigas*', ICES, Copenhagen (Denmark). ICES. CM. F/38, pp. 10.

Boussaïd, B., Gripari, J.L., Renault, T., Tige, G., Dorange, G. (1999) '*Trichodina* sp. infestation of *Crassostrea gigas* oysters in Brittany, France', *Journal of Invertebrates Pathology*, 73, pp. 339–342.

Bower, S. M. (2006) '17 Parasitic Diseases of Shellfish' in *Fish Diseases and Disorders*, 1, pp. 629–677.

Bower, S. M., Mcgladdery, S. E. e Price, I. M. (1994) 'Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish', *Annual Review of Fish Diseases*, 4:1–199.

Buroker, N. (1983) 'Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*', *Malacologia*, 23(2), 271–279.

Cabral, H. N. (1999). 'Ictiofauna do Estuário do Sado'. *Relatórios Científicos e Técnicos, Instituto de Investigação das Pescas e do Mar*, 47, 36 pp.

Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R. e Padilla-Lardizábal, G. (2010) 'Parasites of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico', *Journal of Aquatic Animal Health*, 22(3), pp. 141–151.

Cachola, R. e Ruano, F. (2000) 'Contribuição para a melhoria da qualidade dos moluscos bivalves vivos a introduzir no circuito comercial', *Relatórios Científicos e Técnicos, Instituto de Investigação das Pescas e do Mar*, 52, pp.27.

Caeiro, S. Costa, M. H., Ramos, T. B., Fernandes, F., Silveira, N., Coimbra, A., Medeiros, G. e Painho, M. (2005). 'Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: An Index Analysis Approach'. *Ecological Indicators*, 5: 151-169.

Carballal, M. J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferro-Soto, B. e Villalba, A. (2001) 'Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain)', *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2), pp. 87–97.

Castanos, C., Pascual, M. e Camacho, A. P. (2009) 'Reproductive biology oyster of the non-native oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1773), as a key factor for its successful spread along the rocky shores of northern Patagonia, Argentina', *Journal of Shellfish Research*, 28(4), pp. 837–847.

Catarino, J., Peneda, M.C. e Santana, F. (1987) 'Estudo do Impacte da Indústria no Estuário do Rio Sado, *Estimativas da Poluição Afluente*. DEII, INETI - Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, Lisbon, Portugal.

Chambon, C., Legeay, A., Durrieu, G., Gonzalez, P., Ciret, P. e Massabuau, J. C. (2007) 'Influence of the parasite worm *Polydora* sp. on the behaviour of the oyster *Crassostrea gigas*: A study of the respiratory impact and associated oxidative stress', *Marine Biology*, 152(2), pp. 329–338.

Chávez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Pennec, M., Barret, J., Enríquez-Díaz, M. e Cáceres-Martínez, C. (2003) 'Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*', *Journal of Shellfish Research*, 22 (3), pp. 721-731.

Chávez-Villalba, J. (2001) 'Conditionnement expérimental de l'huître *Crassostrea gigas*', Doctoral dissertation, Brest, pp. 0–162.

Chávez-Villalba, J., Villelas-Ávila, R. e Cáceres-Martínez, C. (2007) 'Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, México', *Aquaculture Research*, 38(3), pp. 268–278.

Cheung, Y. H. e Wong, M. H. (1992) 'Trace metal contents of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) purchased from markets in Hong Kong', *Environmental Management*, 16(6), pp. 753–761.

Chícharo, L. M. Z. (1996) 'Sistemática, ecologia e dinâmica de larvas e pós-larvas de bivalves na Ria Formosa'. Tese de Doutoramento, Universidade do Algarve, Faro, Portugal.

Comps, M. (1988) 'Epizootic diseases of oysters associated with viral infections', *American Fisheries Society Special Publication*, 18(Elston 1979), pp. 23–37.

Cortesão, C. e Vale, C. (1995) 'Metals in sediments of the Sado estuary, Portugal', *Marine Pollution Bulletin*, 30(1), pp. 34–37.

Coutinho, M. T. C. P. (2003) 'Comunidade Fitoplancónica do Estuário do Sado. Estrutura, Dinâmica e Aspectos Ecológicos', *Provas de acesso à categoria de Investigador Auxiliar*, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, Lisboa, Portugal, p. 323.

Cross, I., Merlo, M. A., Rodríguez, M. E., Portela-Bens, S. e Rebordinos, L. (2014) 'Adaptation to abiotic stress in the oyster *Crassostrea angulata* relays on genetic polymorphisms', *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier, 41(2), pp. 618–624.

Le Dantec, J. (1968) 'Ecologie et Reproduction de L' Huitre Portugaise (*Crassostrea angulata* (Lamarck) dans Le Bassin D' Arcachon et sur la rive gauche de la Gironde'. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 32 (3), 237-362.

Darriba Couñago, S. (2016) 'Atlas de Histopatología Moluscos bivalvos mariños', *Intecmar. Xunta de Galicia (Consellería do Mar)*, 1, pp.84.

de la Rua, A.R., Arellano, J.M., de Canales, M.G., Blasco, J. and Sarasquete, C., (2005) 'Accumulation of copper and histopathological alterations in the oyster *Crassostrea angulata*', *Ciencias Marinas*, 31(3), pp.455-466.

Dégremont, L., Ernande, B., Bédier, E. e Boudry, P. (2007) 'Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth', *Aquaculture*, 262(1), pp. 41–53.

Deslous-Paoli, J. M. (1982) 'Croissance et qualité de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg en élevage dans le bassin de Marennes-Oléron', *Tethys*, 10(4), pp. 365–371.

DGRM, Direção-Geral de Recursos Naturais, (2019) *Estatísticas de pesca 2018*, Instituto Nacional de Estatística, I. P.

Dias, M. D. S e Nunes, M. C. (1994) 'Contaminação bacteriana de moluscos bivalves', *Seminário sobre Recursos Haliêuticos, Ambiente, Aquacultura e Qualidade do Pescado da península de Setúbal, Setúbal, (26 - 27 Abril 1994)*,. 1st edn. Publicações avulsas do IPIMAR (livro ISSN: 0872 – 914X),. pp. 195–205.

Dias, M. D. S. (1994) 'Contribuição para o conhecimento da Aquacultura no Estuário do Sado.', *Seminário de Recursos Haliêuticos, Ambiente, Aquacultura e Qualidade do Pescado na Península de Setúbal, Setúbal, (26 - 27 Abril 1994)*,. 1st edn. Publicações avulsas do IPIMAR. (livro ISSN: 0872 – 914X ),. pp. 155–166.

dos Santos, M. E. (1998) 'Golfinhos-Rozes do Sado: Estudos de Sons e Comportamento.', in *Instituto Superior de Psicologia Aplicada. Coleção Teses*. 1st edn.

Dridi, S., Romdhane, M. S.e Elcafsi, M. (2014) 'Gametogenic cycle of *Crassostrea gigas* in contrasting Mediterranean habitats: Marine (Gulf of Tunis) and continental (Bizert lagoon) culture sites', *Journal of Biological Research (Greece)*, 21(1), pp. 1–11.

Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J. e Le Pennec, M. (2009) 'Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy', *Aquaculture International*, 17(5), pp. 491–506.

Fabioux, C., Huvet, A., Lapegue, S., Heurtebise, S. e Boudry, P. (2002) 'Past and present geographical distribution of populations of Portuguese (*Crassostrea angulata*) and Pacific (*C. gigas*) oyster along the European and north African Atlantic coasts', *Société Française de Malacologie, Haliotis* 31: 33-44

Fabioux, C. (2004) 'Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas*: Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosérie', *Doctoral dissertation*, Université de Bretagne occidentale-Brest. p. 210.

Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchua, P., Le Pennec, M. e Pouvreau, S. (2005) 'Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock', *Aquaculture*, 250(1-2),pp. 458–470.

FAO (2019), *Global aquaculture production 1950-2017. Fisheries Global information system. FIGIS - Time-series query on: Aquaculture*. Disponível em: [http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/usr/local/tomcat/8.5.16/figis/webapps/figis/temp/hqp\\_2856238594399321238.xml&outtype=html](http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/usr/local/tomcat/8.5.16/figis/webapps/figis/temp/hqp_2856238594399321238.xml&outtype=html), acedido em Maio/2019

Ferreira, J. G., Simas, T., Nobre, A., Silva, M. C., Shifferegger, K. e Lencart-Silva, J. (2003) 'Identification of sensitive areas and vulnerable zones in transitional and coastal Portuguese systems. Application of the United States National Estuarine Eutrophication Assesment to the Minho, Lima,Douro, Ria de Aveiro, Mondego, Tagus, Sado, Mira, Ria Formosa.' INAG e

IPIMAR. ISBN:972-9412-66-9.

Fisher, W.S. (1986) 'Structure and functions of oyster hemocytes', in *Immunity in invertebrates* (pp. 25-35). Springer, Berlin, Heidelberg.

Flahauw, E., Quéllec, S., Davenel, A., Degremont, L., Lapegue, S. e Hatt, P.J. (2012). 'Gonad volume assessment in the oyster *Crassostrea gigas*: Comparison between a histological method and a magnetic resonance imaging (MRI) method', *Aquaculture*, 370, pp.84-89.

Foighil, D. Ó, Gaffney, P. M., Wilbur, A. E., Hilbish, T. J. (1998) 'Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*', *Marine Biology*, 131(3), pp. 497–503.

Frazier, J. M. (1976) 'The dynamics of metals in the American oyster, *Crassostrea virginica*. II. Environmental effects', *Chesapeake Science*, 17(3), pp. 188–197.

Freitas, M. C., Andrade, C., Cruces, A., Munhá, J., Sousa, M. J., Moreira, S., Jouanneau, J. M., Martins, L. (2008) 'Anthropogenic influence in the Sado estuary (Portugal): a geochemical approach/Influencia antrópica en el estuario de Sado (Portugal): una aproximación geoquímica', *Journal of Iberian Geology* 34 (2) 2008: 271-286

Friedman, C.S., Beattie, J.H., Elston, R.A. e Hedrick, R.P. (1991) 'Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg'. *Aquaculture*, 94(1), pp.1-15.

Friedman, C. S., Estes, R. M., Stokes, N. A., Burge, C. A., Hargove, J. S., Barber, B. J., Elston, R. A., Burrenson, E. M. e Reece, K. S. (2005) 'Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes', *Diseases of Aquatic Organisms* 63, pp. 33–41.

Funes, V., Alhama, J., Navas, J. I., López-Barea, J., Peinado, J. (2006) 'Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral', *Environmental Pollution*, 139(2), pp. 214–223.

Galtsoff, P. S. (1964) The American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service*, 64. United States Government Printing Office, Washington, D. C.

Gaspar, M. B., Ferreira, R. e Monteiro, C. C. (1999) 'Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., ( Mollusca : Bivalvia ) off Faro , southern Portugal', *Fisheries Research*, 41, 309-316

Gaspar, M. B. e Monteiro, C. C. (1998) 'Reproductive Cycles of the Razor Clam *Ensis siliqua* and the Clam *Venus striatula* off Vilamoura , Southern Portugal', *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98), 78, 1247-1258

Gold-Bouchot, G., Simá-Alvarez, R., Zapata-Pérez, O. e Güemez-Ricalde, J. (1995) 'Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metals on the American oyster (*Crassostrea virginica*) from Tabasco, Mexico', *Marine Pollution Bulletin*, 31(4–12), pp. 439–445.

Google. (2018) 'Reserva natural do estuário do Sado.' Google maps. Disponível em <https://www.google.pt/maps>, Acedido em outubro/2018.

Gosling, E. (2003) 'Bivalve Molluscs: Biology, *Ecology and Culture*'. *Blackwell Publishing, Oxford, England*.

Grade, A., Chairi H., Lallias, D., Power, D.M., Ruano, F., Leitão, A., Drago, T., King, J.W., Boudry, P. e Batista, F.M. (2016) 'New insights about the introduction of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata*, into the North East Atlantic from Asia based on a highly polymorphic mitochondrial region', *Aquatic Living Resources*, 29, 404

Grizel, H. e Héral, M. (1991) 'Introduction into france of the japanese oyster (*Crassostrea gigas*)', *ICES Journal of Marine Science*, 47(3), pp. 388–403.

Grizel, H., (1985) '*Mytilicola orientalis* Mori, parasitism/ Parasitose a *Mytilicola orientalis* Mori'. *Fiches d'identification des maladies et parasites des poissons, crustaces et mollusques. Conseil international pour l'exploration de la mer, Copenhagen*, pp.1-4.

Haley, L. E. (1977) 'Sex determination in the American oyster', *Journal of Heredity*, 68(2), pp.114-116.

Han, B. C. e Hung, T. C. (1990) 'Green oysters caused by copper pollution on the Taiwan coast', *Environmental Pollution*, 65(4), pp. 347–362.

Handley, S. J. e Bergquist, P. R. (1997) 'Spionid polychaete infestations of intertidal Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg), Mahurangi Harbour, northern New Zealand', *Aquaculture*, 153(3–4), pp. 191–205.

Heffernan, P. B. e Walker, R. L. (1989) 'Quantitative image analyses methods for use in histological studies of bivalve reproduction', *Journal of Molluscs Studies*, 55, pp. 135–137.

Héral, M. e Deslous-Paoli, J. M. (1991) 'Oyster Culture in European Countries', in Winston Menzel (ed.) *Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture*. Florida, pp. 153-190.

Hine, P.M., Wesney, B. e Hay, B. E. (1992) 'Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*.', *Diseases of Aquatic Organisms*, (12), pp. 135–142.

His, E., Beiras, R. e Seaman, M. N. L. (1999) 'The assessment of marine pollution bioassays with bivalve embryos and larvae', *Advances in Marine Biology*. Elsevier Masson SAS, 37(37), pp. 1–178.

Howard, D.W. e Smith, C.S. 1983 (1983) 'Histological techniques for marine bivalve mollusks', *NOOA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25*, p. 97.

Huvet, A., Lapègue, S., Magoulas, A. e Boudry, P., (2000) 'Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe', *Conservation Genetics*, 1(3), pp. 251–262.

ICNF, Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, I. P. (2018). Disponível em <http://www2.icnf.pt/portal/ap/r-nat/rnes/class-carac>, Acedido em outubro/2018.

Iglesias, D., Rodríguez, L., Gómez, L., Azevedo, C. e Montes, J. (2012) 'Histological survey of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Galicia (NW Spain)', *Journal of Invertebrate Pathology*. Elsevier Inc., 111(3), pp. 244–251.

Imanaka, S., Itoh, N., Ogawa, K. e Wakabayashi, H. (2001) 'Seasonal fluctuations in the occurrence of abnormal enlargement of the ovary of Pacific oyster *Crassostrea gigas* at Gokasho Bay, Mie, Japan', *Fish Pathology*. Japanese Society of Fish Pathology, 36(2), pp. 83–91.

Jeng, M.S., Jeng, W.L., Hung, T.C., Yeh, C.Y., Tseng, R.J., Meng, P.J. e Han, B.C. (2000) 'Mussel watch: a review of Cu and other metals in various marine organisms in Taiwan, 1991–98'. *Environmental Pollution*, 110(2), pp.207-215.

- Joaquim S., Matias D. e Moreno Ó. (2008) '*Cultivo de bivalvos en criadero/ Cultivo de bivalves en maternidade*', Junta de Andalucía, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Conserjería de Agricultura y Pesca, Sevilla
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M. e Poulet, S. A. (2001) 'A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France)', *Diseases of Aquatic Organisms*, 46(2), pp. 139–145.
- Lango-Reynoso, F. (1999) 'Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)'. *These de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale*.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villalba, J., Cochard, J. C. e Le Pennec, M. (2000) 'Oocyte size, a means to evaluate the gametogenetic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg).', *Aquaculture*, 190, pp. 183–199.
- Lassudrie, M., Wikfors, G. H., Sunila, I., Alix, J. H., Dixon, M. S., Combet, Doriane., Soudant, P., Fabioux, C. e Hégaret, H. (2015) 'Physiological and pathological changes in the eastern oyster *Crassostrea virginica* infested with the trematode *Bucephalus* sp. and exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*', *Journal of Invertebrate Pathology*. Elsevier Inc., 126, pp. 51–63.
- Lin, S. e Hsieh, I. J. (1999) 'Occurrences of green oyster and heavy metals contaminant levels in the Sien-San area, Taiwan', *Marine Pollution Bulletin*, 38(11), pp. 960–965.
- Lowe, D. M. e Pipe, R. K. (1986) 'Hydrocarbon exposure in mussels: A quantitative study of the responses in the reproductive and nutrient storage cell systems', *Aquatic Toxicology*, 8(4), pp. 265–272.
- Lubet, P. (1994) 'Mollusc culture', in G. Barnabé (ed.). *Aquaculture: biology and ecology of cultured species*. Ellis Horwood, Great Britain., pp. 81–173.
- Lunz, G. R. (1941) '*Polydora*, a pest in South Carolina oysters', *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*, 57(2), pp. 273–283.
- Luo, Y., Li, C., Landis, A. G., Wang, G., Stoeckel, J. e Peatman, E. (2014) 'Transcriptomic Profiling of Differential Responses to Drought in Two Freshwater Mussel Species, the Giant Floater *Pyganodon grandis* and the Pondhorn *Unio merus tetralasmus*', *PLoS One*, 9(2).
- Mann, R. (1979) 'Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* at sustained elevated temperatures', *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 59(1), pp. 95–110.
- Martins, F. Leitão, P., Silva, A. e Neves, R., (2001) '3D modelling in the Sado estuary using a new generic vertical discretization approach', *Oceanologica Acta*, 24, pp. 51–62.
- Matias, D. (2008) 'Produção de bivalves.', in Silva, H. A. e Batista, I. (eds.) (2008). *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*. Publicações Avulsas do IPIMAR. Lisboa. 20th edn, p. 171.
- Matias, D., Joaquim, S., Matias, A.M., Moura, P., de Sousa, J.T., Sobral, P. e Leitão, A. (2013) 'The reproductive cycle of the European clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758) in two Portuguese populations: Implications for management and aquaculture programs', *Aquaculture*, 406, pp. 52–61.
- McDonald, J. H. (2014) 'Handbook of Biological Statistics (3rd ed.).' Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland., pp. 68–76.

Meyers, T. e Hendricks, J. (no date) 'A Summary of Tissue Lesions in Aquatic Animals Induced by Controlled Exposures to Environmental Contaminants , Chemotherapeutic Agents , and Potential Carcinogens A Summary of Tissue Lesions in Aquatic Animals Induced by Controlled Exposures to Environmen', *Marine Fisheries Review*, 44(12):1-17

de Montaudouin, X., Paul-Pont, I., Lambert, C., Gonzalez, P., Raymond, N., Jude, F., Legeay, A., Baudrimont, M., Dang, C., Le Grand, F. e Le Goïc, N., (2010) 'Bivalve population health: Multistress to identify hot spots', *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier Ltd, 60(8), pp. 1307–1318.

Moore, J. D., Juhasz, C. I. e Robbins, T. T. (2011) 'A histopathology survey of California oysters', *California Fish and Game*, 97, pp. 68–83.

Muranaka, M.S. and Lannan, J.E. (1984) 'Broodstock management of *Crassostrea gigas*: Environmental influences on broodstock conditioning.', *Aquaculture* 39(1-4), pp. 217–228.

Nascimento, I. A. Smith, D.H., Kern II, F. and Pereira, S.A (1986) 'Pathological findings in *Crassostrea rhizophorae* from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil', *Journal of Invertebrate Pathology*, 47(3), pp. 340–349.

Nel, R., Coetzee, P. S. e Van Niekerk, G. (1996) 'The evaluation of two treatments to reduce mud worm (*Polydora hoplura* Claparède) infestation in commercially reared oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg)', *Aquaculture*. Elsevier, 141(1–2), pp. 31–39.

Nell, J. (2007) 'Controlling mudworm in oysters', Primefact 290. NSW Department of Primary Industries, Port Stephens Fisheries Centre, Nelson Bay, NSW, 4pp

Nicolas, J.L., Comps, M. e Cochenec, N. (1992) 'Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*', *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 12 (1), pp. 11–13.

Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H. e Boudry, P., (2009) 'Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction', *Aquatic Biology*, 7(3), pp. 229–241.

Normand, J., Le Pennec, M. e Boudry, P. (2008) 'Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave', *Aquaculture*, 282(1–4), pp. 124–129.

Okazaki, R. K. e Panietz, M. H. (1981) 'Depuration of twelve trace metals in tissues of the oysters *Crassostrea gigas* and *C. virginica*', *Marine Biology*. Springer-Verlag, 63(2), pp. 113–120.

Pascual, M. (1971) 'Estudios sobre la reproduccion del ostión *Crassostrea angulata* (Lamk) en la Bahia de Cádiz.', in. Invest. Pesq., pp. 639–646.

Pauley, G. B., Chew, K. K. e Sparks, A. K. (1967) 'Experimental infection of oysters (*Crassostrea gigas*) with thigmotrichid ciliates', *Journal of Invertebrate Pathology*, 9(2), pp. 230–234.

Pessoa, M. F., Rosa, A. e Oliveira, J. S. (2000) '*Crassostrea angulata*. Lam na Monitorização de Compostos Organoestanosos a partir de Índices de Espessamento da Concha-Resultados Preliminares', in Gaspar Soares de Carvalho, F. V. G. e F. T. P. (ed.) "*Os Estuários de Portugal e os Planos de Bacia Hidrográfica*", E. Lisboa: Associação Eurocoast-Portugal, pp. 45–52.

Pipe, R. K. e Coles, J. A. (1995) 'Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs', *Fish and Shellfish Immunology*, 5(8), pp. 581–595.



Pouvreau, S., Petton, S., Queau, I., Bellec, G., Talarmain, E., Le Souchu, P., Alunno-Bruscia, M., Auby, I., Maurer, D., D'Amico, F., Passoni, S., Barbier, C., Tournaire, M., Rigouin, L., Rumebe, M., Fleury, E., Langlade, A., Bouget, J., Collin, K., Fortune, M., Palvadeau, H., Bedier, E., Robert, S., Pepin, J., Grizon, J., Seugnet, J., Chabirand, J., Le Moine, O., Guesdon, S., Lagarde, F., Mortreux, S., Le Gall, P., Messiaen, G., Roque D'Orbcastel, E., Quemener, L., Repecaud, M., Bucas, K., Barbot, S., Guillemot, A., Nonnotte, L., Duros, W., Bonnat, A., Tarot, S., Mille, G. D., Geay, A. e Bouquet, A. (2015). Observer, Analyser et Gérer la variabilité de la reproduction et du recrutement de l'huître creuse en France: Le Réseau Velyger. Rapport annuel 2014.

Qin, J. Huang, Z., Chen, J., Zou, Q., You, W. e Ke, C. (2012) 'Sequencing and de novo analysis of *Crassostrea angulata* (Fujian Oyster) from 8 different developing phases using 454 GSFLx', *PLoS ONE*, 7(8).

Ren, J. S., Marsden, I.D., Ross, A.H. e Schiel, D.R. (2003) 'Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand', *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 37(1), pp. 171–182.

Renault, T. (1996) 'Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade', *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 15(2), pp. 551–561.

Renault, T. e Cochenne, N. (1994) 'Rickettsia-like Organisms in the Cytoplasm of Gill Epithelial Cells of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*', *Journal of Invertebrate Pathology*, 64(2), pp. 160–162.

Renault, T. e Novoa, B. (2004) 'Viruses infecting bivalve molluscs', *Aquatic Living Resources*, 17(4), pp. 394–409.

Roper, D. S., Pridmore, R.D., Cummings, V.J. e Hewitt, J.E., (1991) 'Pollution related differences in the condition cycles of pacific oysters *Crassostrea gigas* from Manukau Harbour, New Zealand', *Marine Environmental Research*, 31(3), pp. 197–214.

Royer, J., Segueineau, C., Park, K.I., Pouvreau, S., Choi, K.S. e Costil, K. (2008) 'Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy', *Aquaculture*, 277(3–4), pp. 313–320.

Ruano, F. e Dias, M. D. (1994) 'Contribuição para o apoio à moluscicultura no Estuário do Sado e Lagoa de Albufeira.', in *Seminário sobre Recursos Haliêuticos, Ambiente, Aquacultura e Qualidade do Pescado da península de Setúbal*, (Setúbal 26 - 27 Abril 1994). Publicações avulsas do IPIMAR, 1, pp. 195–205.

Ruano, 1997 (1997) 'Fisheries and farming of important marine bivalves in Portugal' in *The history, present condition and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe*, 3, NOAA Technical Report NMFS, (129), pp. 191–200.

Ruano, F. (2008) 'Uma Perspectiva Sanitária do Sector da Moluscicultura em Portugal', in Silva, H. A. e Batista, I., *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*. Publicações Avulsas do IPIMAR, 20, pp.62-73.

Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., Garcia-Martin, L.O. e Lopez, J.S., (1992). 'Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain', *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 155(2), pp.249-262.

- Sabry, R. C., Gesteira, T.C.V., Magalhães, A.R.M., Barracco, M.A., Guertler, C., Ferreira, L.P., Vianna, R.T. e da Silva, P.M. (2013). 'Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti River Estuary, Ceará State, Brazil', *Journal of Invertebrate Pathology*. Elsevier Inc., 112(1), pp. 24–32.
- Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N. e Renault, T. (2010). 'Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008', *Virus Research*, 153(1), pp. 92–99.
- Sequeira, M., Matias S., Farinha J.C., Gaspar R., Silva C., Augusto, J., Ferreira, C.V., Fonseca, M.J., Narra, P. and Luís, A.R., (2009). 'Bases para o plano de acção para a salvaguarda e monitorização da população de Roazes do estuário do Sado. Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, pp.80.
- Shaw, B.L. e Battle, H.I. (1957) 'The gross and microscopic anatomy of digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin)'. *Can. J. Zool.* 35: 325- 347.
- Shumway, S.E. (1996) 'Natural Environmental Factors', in *The Eastern Oyster, Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant College Publication, 13, pp.467-513.
- Silva, H. A., Costa, P. e Rodrigues, S. (2008) 'Morfologia, Biologia e Ecologia dos Moluscos Bivalves.', in Silva, H. A. e Batista, I., *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal. Publicações Avulsas do IPIMAR. Lisboa.* 20, pp. 17-38.
- Soletchnik, P. Huvet, A., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Goulletquer, P. and Boudry, P. (2002) 'A comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids', *Aquatic Living Resources*, 15(4), pp. 243–250.
- Sparks, A. K. (1962) 'Metaplasia of the gut of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) caused by infection with the copepod *Mytilicola orientalis* Mori. *Journal of Insect Pathology* 4(1):57-62.
- Steele, S. e Mulcahy, M.F. (1999) 'Gametogenesis of the Oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland', *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79(4), pp.673-686.
- Steele, S. and Mulcahy, M. F. (2001) 'Impact of the copepod *Mytilicola orientalis* on the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Ireland', *Diseases of Aquatic Organisms*, 47(2), pp. 145–149.
- Tay KL, Teh SJ, Doe K e Lee K, J. P. (2003) 'Histopathologic and histochemical biomarker responses of Baltic clam, *Macoma balthica*, to contaminated Sydney Harbour sediment, Nova Scotia, Canada.', *Environmental health perspectives*, 111(3), pp. 273–280.
- Teixeira de Sousa, J. (2014) 'Study of broodstock conditioning and determination of markers of gamete quality in the European clam *Ruditapes decussatus*', Doctoral dissertation, Brest.
- Tun, K. L., Itoh, N., Shimizu, Y., Yamanoi, H., Yoshinaga, T. e Ogawa, K. (2008) 'Pathogenicity of the protozoan parasite *Marteilioides chungmuensis* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*', *International Journal for Parasitology*, 38(2), pp. 211–217.
- Varotto, L., Domeneghetti, S., Rosani, U., Manfrin, C., Cajarville, M.P., Raccanelli, S., Pallavicini, A. e Venier, P. (2013) 'DNA damage and transcriptional changes in the gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to nanomolar doses of combined metal salts (Cd, Cu, Hg)', *PLoS ONE*, 8(1).

Vaschenko, M. A., Hsieh, H.-L. e Radashevsky, V. I. (2013) 'Gonadal State of the Oyster *Crassostrea Angulata* Cultivated in Taiwan', *Journal of Shellfish Research*, 32(2), pp. 471–482.

Vilela (1975) 'A respeito de ostras - Biologia – Exploração - Salubridade'. Notas e Estudos da Secretaria de Estado das Pescas. Série – Recursos e Ambiente Aquáticos, N.º1. Serviço de Publicações e Comunicações do Gabinete de Coordenação da SEP, Lisboa.', p. 220.

Wang, H., Qian, L., Liu, X., Zhang, G. e Guo, X. (2010) 'Classification of a common cupped oyster from southern China', *Journal of Shellfish Research*, 29(4), pp. 857–866.

Wang, L. e Wang, W. X. (2014) 'Depuration of metals by the green-colored oyster *Crassostrea sikamea*', *Environmental Toxicology and Chemistry*. Wiley Blackwell, 33(10), pp. 2379–2385.

Wargo, R. N. e Ford, S. E. (1993) 'The effect of shell infestation by *Polydora* sp. and infection by *Haplosporidium nelsoni* (MSX) on the tissue condition of oysters, *Crassostrea virginica*', *Estuaries*, 16(2), pp. 229–234..

WORMS, *World Register of Marine Species* (2019), disponível em <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=146900>, acedido em Fevereiro/2019.

Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K. e Jr, S.K.A., (1998) 'Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg', *Evolution*, 52(2), pp.394-402.

Yin, D. (1996) 'Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores', *Free Radical Biology and Medicine*, 21(6), pp. 871–888.

Zwann, A. de, e Mathieu, M. (1992) 'Cellular biochemistry and endocrinology.', in E.M. Gosling (ed.) *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam., pp. 223–307.

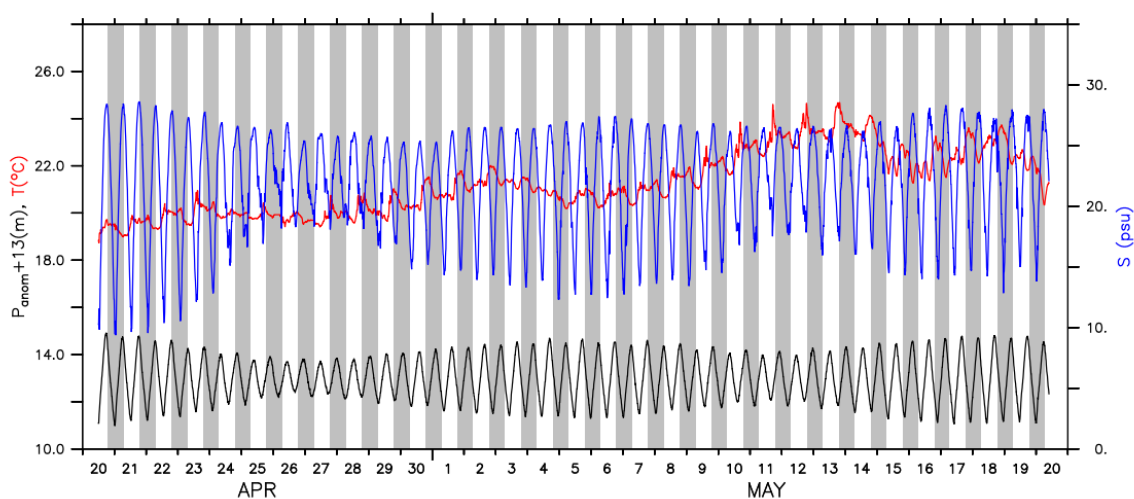
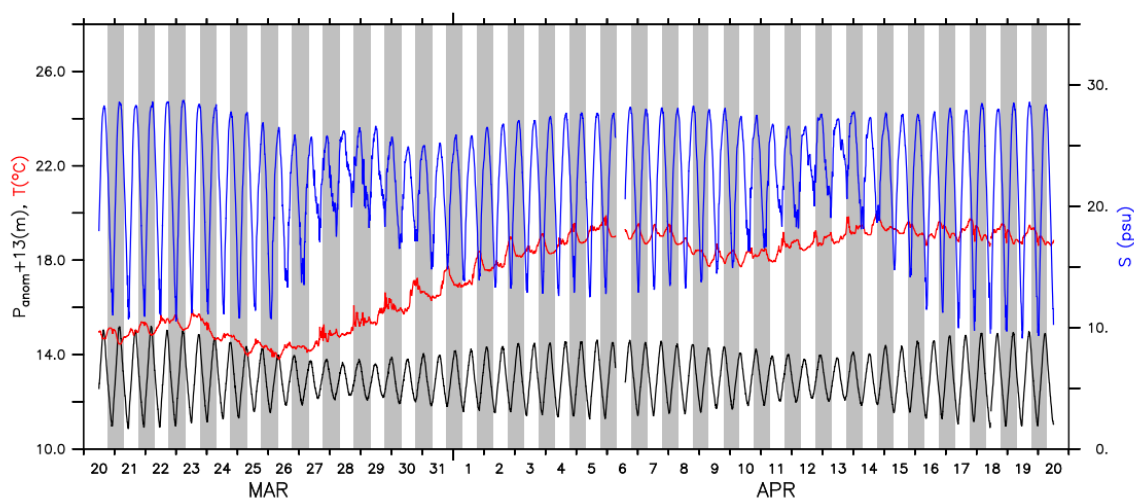
**CAPITULO 6.**

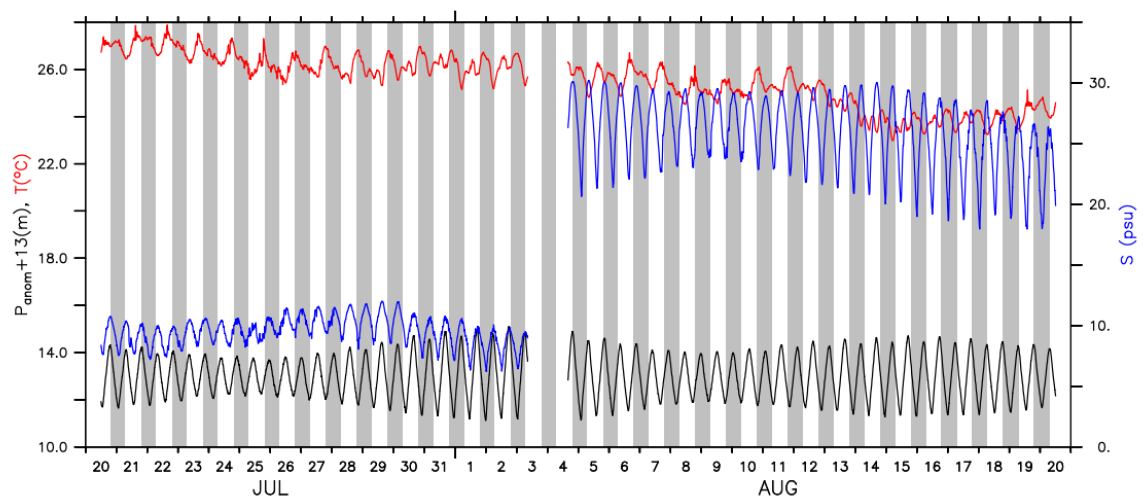
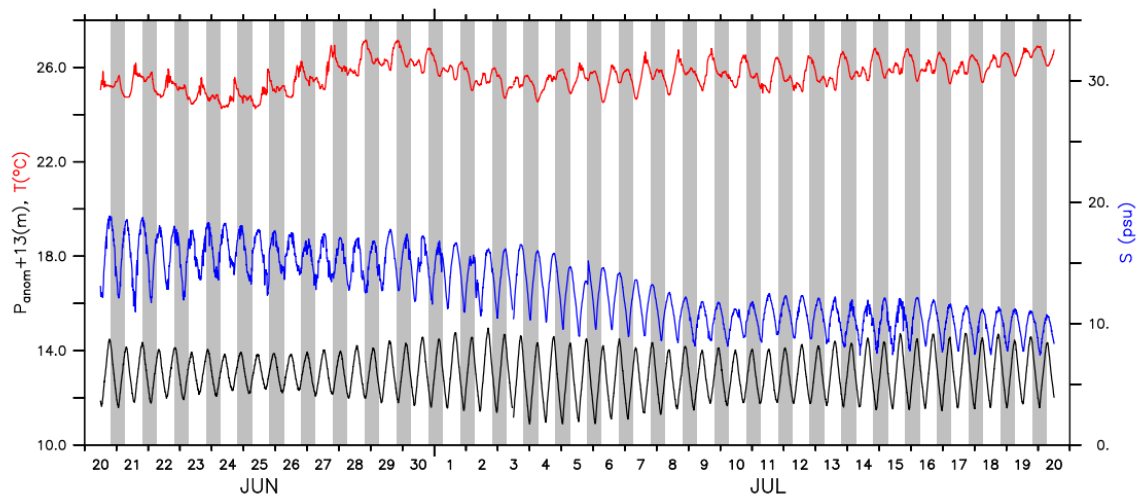
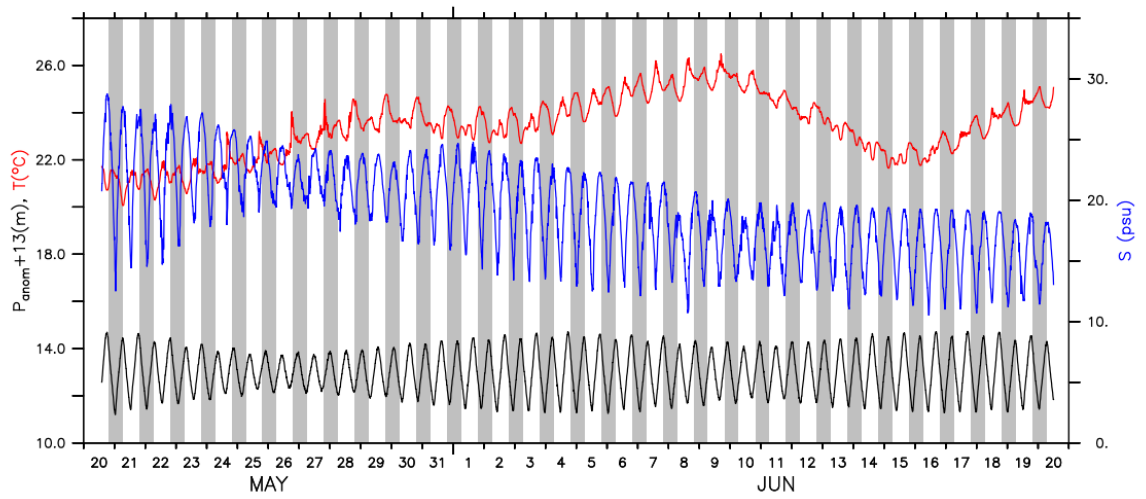
**ANEXOS.**

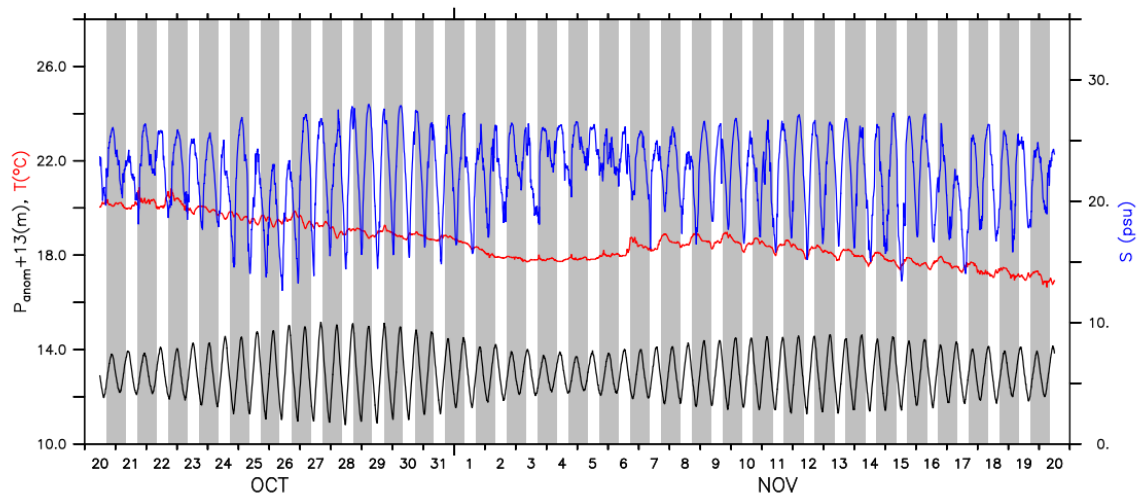
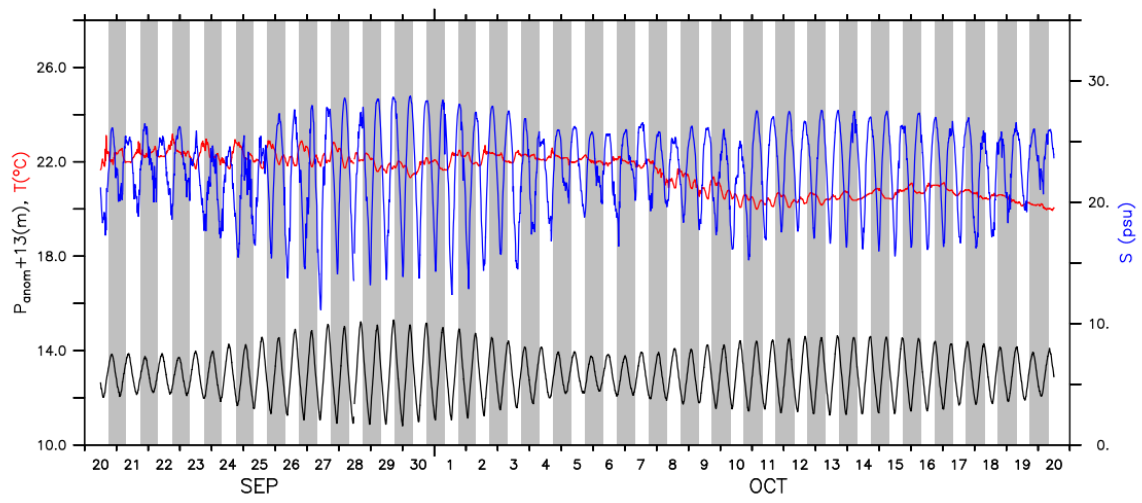
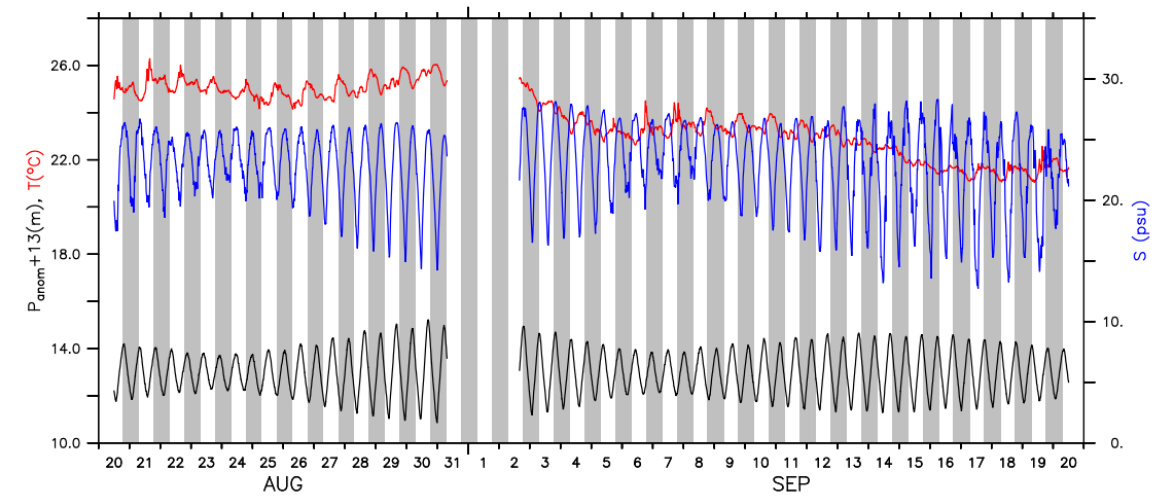
---

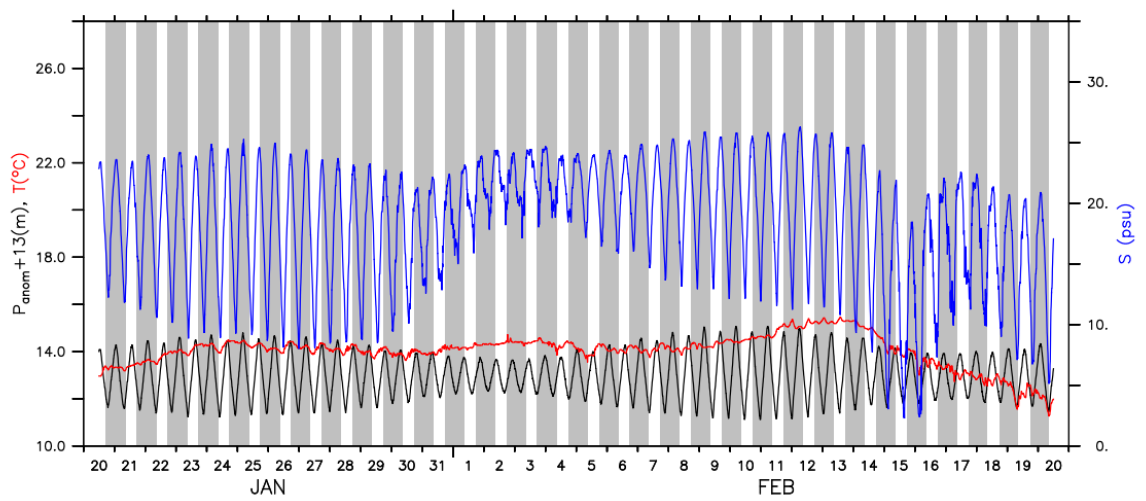
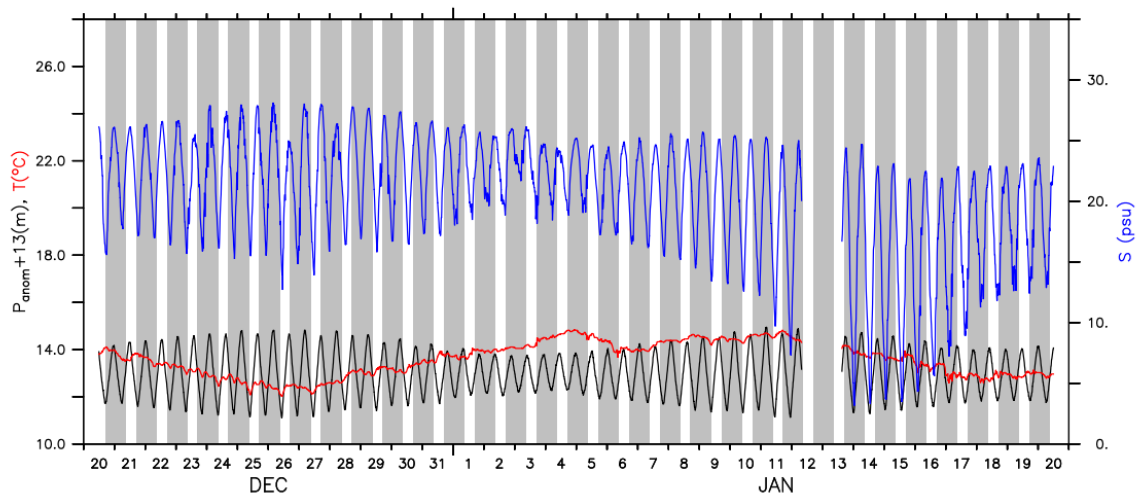
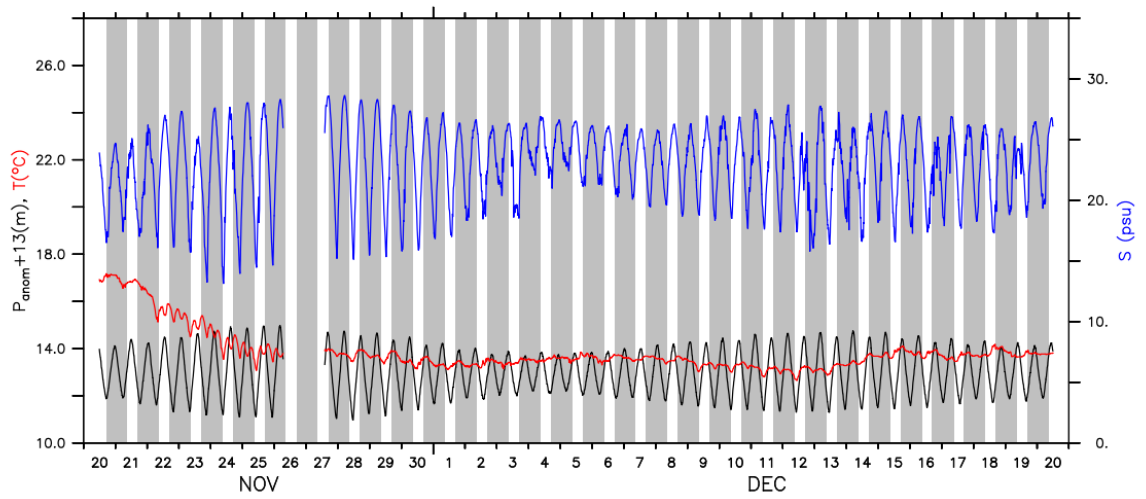
## 6. Anexos

**Anexo I.** Distribuição temporal de temperatura, salinidade e pressão registadas em contínuo através de sensores fundeados no canal de Alcácer do Sal, junto ao banco Batalha, no período de Março de 2015 a Março de 2016 (taxa de amostragem de 10 min). Dados retirados do projecto crassosado,2016.

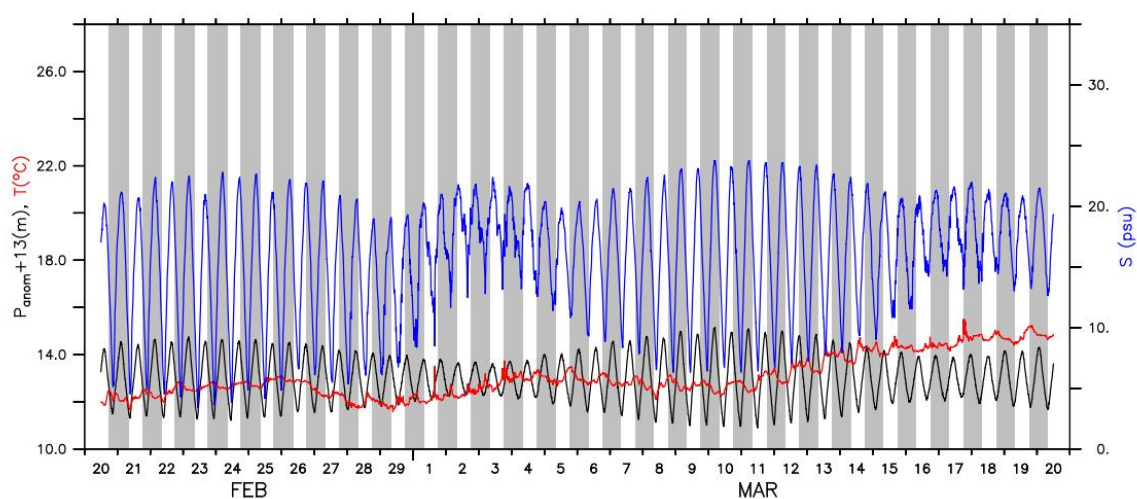












**Anexo II.** Resumo dos resultados dos testes pareados complementares ao teste PERMANOVA.

<b>PAIR-WISE TESTS</b>		
<b>Factor local</b>	<b>t</b>	<b>P(perm)</b>
Banco, Viveiro		
Junho	2.8888	0.001
Setembro	2.3917	0.001
Dezembro	2.1524	0.003
Março2016	1.6951	0.017

<b>PAIR-WISE TESTS</b>		
<b>Factor época</b>	<b>t</b>	<b>P(perm)</b>
(Banco)		
Junho, Setembro	3.2106	0.001
Junho, Dezembro	2.4404	0.001
Junho, Março	3.1622	0.001
Setembro, Dezembro	1.6934	0.026
Setembro, Março	3.3219	0.001
Dezembro, Março	1.896	0.006

<b>PAIR-WISE TESTS Factor época (Viveiro)</b>	<b>t</b>	<b>P(perm)</b>
Junho, Setembro	1.7726	0.021
Junho, Dezembro	2.7749	0.001
Junho, Março	2.5573	0.001
Setembro, Dezembro	1.7871	0.013
Setembro, Março	2.2127	0.001
Dezembro, Março	2.0147	0.005

### Anexo III. Resultados da análise SIMPER

#### Grupo: Banco

Average similarity: 87.04

Species	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
Cero.	1.79	6.62	2.28	7.60	7.60
H.Br	1.63	5.94	2.28	6.82	14.42
Ci.Gd	1.44	5.57	3.04	6.40	20.82
Met.Gd	1.37	5.34	3.36	6.14	26.96
Ric.	1.27	5.07	4.45	5.83	32.79
Ci.BrMt	1.24	5.05	4.82	5.80	38.59
H.Mt	1.25	4.98	4.42	5.72	44.31
N.Br	1.15	4.91	6.44	5.64	49.95
E.Mt	1.13	4.89	7.52	5.61	55.56
H.Gd	1.16	4.88	5.85	5.60	61.16
H.Tc	1.16	4.86	7.06	5.58	66.74
Esp.	1.09	4.85	8.85	5.57	72.31
E.Tc	1.08	4.83	10.45	5.55	77.86
Cop.	1.07	4.83	10.37	5.55	83.41
N.Tc	1.06	4.82	10.62	5.54	88.95
N.Gd	1.03	4.81	12.03	5.53	94.48

#### Grupo: Viveiro

Average similarity: 90.16

Species	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
H.Br	1.52	6.07	2.40	6.73	6.73
Cero.	1.58	6.05	2.81	6.71	13.44
Ci.Gd	1.39	5.77	2.92	6.39	19.84
Ci.BrMt	1.18	5.26	6.12	5.84	25.67
N.Br	1.15	5.23	6.79	5.80	31.48
Met.Gd	1.18	5.22	7.06	5.79	37.27
E.Mt	1.08	5.21	6.62	5.78	43.04
Ric.	1.16	5.19	7.24	5.75	48.80
H.Tc	1.10	5.16	9.41	5.72	54.52
Cop.	1.07	5.15	10.63	5.71	60.23

H.Gd	1.09	5.14	10.42	5.70	65.92
Esp.	1.04	5.13	13.47	5.69	71.61
H.Mt	1.02	5.12	15.49	5.68	77.29
N.Tc	1.00	5.12	15.49	5.68	82.97
N.Mt	1.01	5.12	15.49	5.68	88.64
N.Gd	1.01	5.12	15.49	5.68	94.32

**Grupos:** Banco (B) e Viveiro (V)  
Average dissimilarity = 12.39

Species	Group B Av.Abund	Group V Av.Abund	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
Cero.	1.79	1.58	2.15	1.10	17.39	17.39
H.Br	1.63	1.52	2.09	0.99	16.88	34.28
Ci.Gd	1.44	1.39	1.38	0.82	11.14	45.41
Met.Gd	1.37	1.18	1.11	0.70	8.94	54.35
Ric.	1.27	1.16	0.88	0.61	7.14	61.49
Ci.BrMt	1.24	1.18	0.84	0.57	6.76	68.25
N.Br	1.15	1.15	0.62	0.52	4.99	73.24
H.Mt	1.25	1.02	0.61	0.40	4.92	78.16
H.Tc	1.16	1.10	0.57	0.41	4.62	82.77
H.Gd	1.16	1.09	0.55	0.37	4.48	87.25
E.Mt	1.13	1.08	0.46	0.44	3.71	90.97

**Anexo IV.** Resumo dos resultados da regressão linear múltipla, com o estado de carnes e o estado de desenvolvimento da gónada de cada ostra amostrada como variáveis independentes e o valor do índice como variável dependente

	Coefficient	Std. Error	t	P
Constant	7.525	0.585	12.874	<0.001
Estado de carnes	-0.724	0.266	-2.724	0.007
Estado de Maturação	0.150	0.209	0.716	0.475